



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**Nanotoxicidad producida por implantes fabricados de
aleaciones Cromo-Cobalto.**

Nanotoxicity produced by implants made of chromium-cobalt
alloys.

Autor: D. Laura Pérez Fernández

Director: Dr. Iñigo Casafont Parra

Santander, Junio 2020

<u>RESUMEN</u>	5
<u>ABSTRACT</u>	5
<u>PALABRAS CLAVE</u>	5
<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	7
1.1. NANOMATERIALES	7
1.1.1. DEFINICIÓN.....	7
1.1.2. CLASIFICACIÓN.....	7
1.1.3. APLICACIÓN EN LOS PRODUCTOS DE CONSUMO.....	9
1.1.3.1. Función que desempeñan.....	10
1.1.3.2. Usos y efecto en la salud.....	11
1.2. NANOTOXICIDAD	11
1.2.1. GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENÉESIS.....	13
1.2.2. EFECTOS SOBRE LA SALUD.....	15
<u>2. OBJETIVOS</u>	17
<u>3. METODOLOGÍA</u>	17
<u>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	18
4.1. LA PRÓTESIS DE CADERA	18
4.1.1. TIPOS.....	18
4.1.2. PRÓTESIS UTILIZADAS EN ARTROPLASTIA TOTAL DE CADERA.....	20
4.2. COMPLICACIONES EN LAS PRÓTESIS MoM	21
4.3. EL COBALTO EN LA SALUD: INTRODUCCIÓN A LA GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENÉESIS	23
4.4. NANOTOXICIDAD DEL COBALTO Y SUS EFECTOS EN LA SALUD: IMPACTO EN LA ARTROPLASTIA DE CADERA	24
4.5. PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO EN LOS PACIENTES	33
<u>5. CONCLUSIONES</u>	38
<u>6. AGRADECIMIENTOS</u>	39
<u>7. BIBLIOGRAFÍA</u>	39

ABREVIATURAS

ADN

Ácido desoxirribonucleico

Cr-Co

Cromo-Cobalto

CoC

Artroplastia Cerámica sobre Cerámica

CoM

Artroplastia Cerámica sobre Metal

CoP

Artroplastia Cerámica sobre Polietileno

HRA

Artroplastia de resuperficialización

NMs

Nanomateriales

NPs

Nanopartículas

MoM

Artroplastia Metal sobre Metal

MoP

Artroplastia Metal sobre Polietileno

ROS

Especies reactivas de oxígeno

THA

Artroplastia total de cadera

RESUMEN

En los últimos años se ha vivido un auge en el uso de los nanomateriales en la industria y los productos de consumo, sus ventajas han permitido que se hagan un hueco en ámbitos médicos y sean comúnmente empleados en prótesis de cadera MoM en forma de aleaciones Cr-Co. Sin embargo, el aumento en la tasa de recambio de este tipo de prótesis secundariamente a fallos ha abierto un debate en torno a su posible capacidad nanotóxica derivada de la liberación de estas nanopartículas metálicas en la zona de implantación. Diversos estudios han evaluado el potencial nanotóxico, principalmente en el cobalto, demostrándose la inducción de genotoxicidad e incluso capacidad carcinogénica. En consecuencia, sus posibles efectos adversos a nivel local y distribución a nivel sistémico suponen un problema social que requiere una mayor investigación. Esta revisión se centra en el conocimiento actual sobre el potencial de genotoxicidad y carcinogenicidad de las nanopartículas de cobalto, en estudios de mamíferos *in vitro* e *in vivo* y su aplicación clínica en los pacientes portadores de prótesis de cadera MoM, así como la necesidad de establecer un sistema sencillo de medición de estas nanopartículas en los pacientes para mejorar el seguimiento, es decir, realizar controles rutinarios para regular las concentraciones de estos metales y predecir las apariciones de efectos clínicos.

ABSTRACT

In recent years there has been a huge impact by the use of nanomaterials in the industry and consumer products, their advantages have allowed them to make a dent in medical fields and are commonly used in MoM hip prostheses in the form of Cr-Co alloys. However, the increase in the rate of replacement of this type of prosthesis secondarily to failures has opened a debate around its possible nanotoxic capacity derived from the release of wear debris metallic nanoparticles in the implantation zone. Several studies have evaluated the nanotoxic potential, mainly in cobalt, demonstrating the induction of genotoxicity and even carcinogenic capacity. Consequently, local adverse effects and possible systemic distribution represent a social problem that requires further investigation. This review focuses on current knowledge about the potential genotoxicity and carcinogenicity of cobalt nanoparticles, *in vitro* and *in vivo*, and their clinical application in patients with MoM hip prostheses, as well as the need to establish a simple system for measuring these nanoparticles in patients to improve monitoring, that is, to perform routine controls to regulate the concentrations of these metals and predict the occurrence of clinical effects.

PALABRAS CLAVE:

DNA, genotoxicidad, carcinogénesis, nanomateriales, nanopartículas, nanotoxicidad, artroplastia.

1. INTRODUCCIÓN

La década de los años 80 marcó el auge de la nueva era nanotecnológica, consecuencia del desarrollo de modernos procesos y métodos de síntesis de materiales estructurados a escala nanométrica. Estos “nanomateriales” poseen propiedades únicas, que posibilitan un amplio horizonte para la innovación, producción y aplicación en la actualidad. Su espectro de actuación ha permitido que en los últimos años se hayan incorporado exponencialmente en el sector industrial y productos de consumo, pero también que surja la preocupación acerca de los posibles efectos adversos, tanto para la salud humana como para el ambiente.

1.1. NANOMATERIALES

1.1.1. DEFINICIÓN

Por definición, los nanomateriales (NMs) son todos aquellos materiales con al menos una de sus dimensiones pertenecientes al rango entre 1 y 100 nm (escala nanométrica). Los NMs son uno de los productos principales de las empresas nanotecnológicas en la fabricación de partículas, tubos o fibras a nanoescala, considerando la nanotecnología, con el desarrollo de estos materiales, como una revolución en el mundo actual.

Los NMs difieren significativamente de otros materiales tradicionales de una escala mayor debido a que poseen un tamaño extremadamente pequeño, una alta superficie relativa y por sus efectos a nivel cuántico. Estos factores pueden cambiar o mejorar sus propiedades, como por ejemplo la reactividad, la resistencia, propiedades eléctricas y las características ópticas. Además, las diferentes propiedades que presentan pueden ser controladas variando el tamaño de las nanopartículas (NPs), de manera que las propiedades particulares del material pueden ajustarse al tipo de aplicación o al fenómeno que se desea estudiar, es decir, las leyes de la mecánica dejan de aplicarse y se cumplen las leyes de la mecánica cuántica. Por este motivo, la nanotecnología está revolucionando nuestro estilo de vida en diversas áreas como la microelectrónica, medicina, farmacia, productos de cuidado personal, recubrimientos químicos y alimentación. Adecuando el uso de NMs a una amplia variedad de aplicaciones en bienes de consumo, dispositivos médicos y diagnósticos, productos farmacéuticos, aditivos combustibles y otros usos industriales (1).

Como resultado, el número de productos manufacturados que contienen NMs está en constante aumento; en 2006, los fabricantes informaron de que los NMs se incorporaron en más de 600 productos de consumo privado por valor de 50.000 millones de dólares en valor de mercado. En 2013 han sido 1.600 productos de consumo los que han contenido NMs (2).

1.1.2. CLASIFICACIÓN

Hoy en día, los NMs, pueden ser clasificados de acuerdo a sus dimensiones, su origen y su composición química (Figura 1). Antes del desarrollo de los NMs por el mundo tecnológico, ya existían NMs naturales en nuestro entorno, como parte de compuestos minerales, ceniza volcánica, aerosol oceánico o virus. Posteriormente se

introdujeron estos NMs en la industria, bien de manera artificial o por aparición no intencional, es decir, subproductos accidentales de los procesos industriales (3). Estos NMs que han sido creados por el hombre o como resultados de las actividades humanas van a ser los llamados nanomateriales antropogénicos.

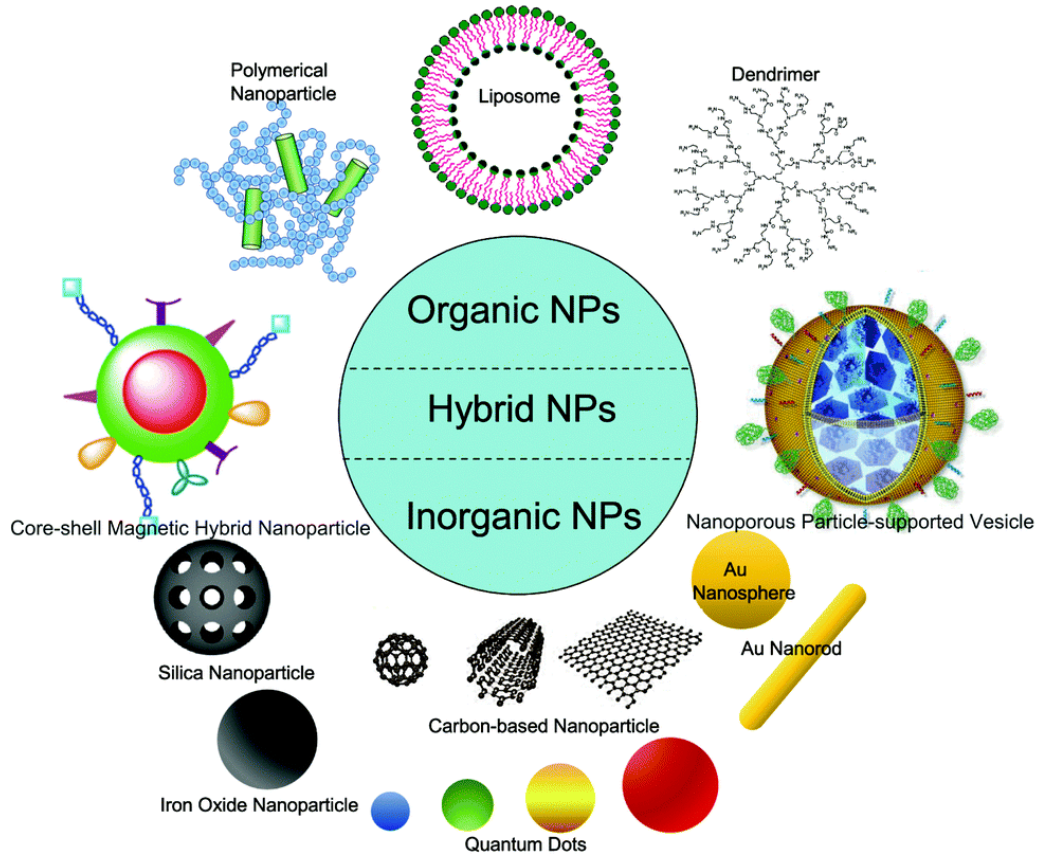


Figura 1. Clasificación de los nanomateriales

Nos vamos a centrar en la clasificación de los nanomateriales antropogénicos, que según la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de Estados Unidos, se clasifican en cuatro tipos de acuerdo a su composición química:

- **Basados en carbono:** están compuestos en un gran porcentaje de carbono y suelen adoptar formas esféricas huecas, elipsoides o tubos. Van a formar parte de este grupo los fullerenos, el grafeno y los nanotubos de carbono de pared simple o múltiple. El grafeno es la base de las formas alotrópicas gráficas encontradas y mediante su empaquetamiento puede formar fullerenos (una lámina en forma de esfera), grafito (varias capas apiladas interaccionando entre sí mediante enlaces de Van der Waals e interacciones II-II en forma de esfera) y nanotubos de carbono (lámina enrollada sobre sí misma en forma de cilindro). Todos ellos tienen una excelente conductividad térmica y eléctrica. Se utilizan para microelectrónica, catálisis, baterías, capas conductoras, supercondensadores, sistemas de purificación de agua, plásticos, implantes ortopédicos, adhesivos y sensores.
- **Basados en metales,** se dividen a su vez en:

- *Quantum dots*: Seleniuro de Cadmio, Teluro de Cadmio, Fosfuro de Indio y Seleniuro de Zinc. Son nanocristales semiconductores que tienen un núcleo reactivo que controla sus propiedades ópticas. Resultan útiles como agentes de contraste para el marcaje celular en el diagnóstico *in vivo*.
- *Formados por metales nobles*: Nanopartículas de Cobalto, Nanopartículas de Oro, Nanopartículas de Plata y Óxidos metálicos como el Dióxido de Titanio o el Óxido de Zinc. Obtenidas mediante la reducción de las soluciones de sales de metales; sus propiedades físicas se pueden controlar variando las condiciones de reducción. Este grupo va a ser especialmente interesante a lo largo de este trabajo, que se va a centrar, en gran parte, en las Nanopartículas de Cobalto y su nanotoxicidad en el organismo, especialmente en los implantes de cadera.
- **Dendrimeros**: son polímeros altamente ramificados y esféricos con arquitectura de núcleo-corteza. Son polímeros multifuncionales cuyo tamaño, topología, flexibilidad y peso molecular puede ser controlado. La forma y la reactividad están determinados por su generación, la composición química del centro e interior de las ramas y las funcionalidades de la superficie (1).
- **Compuestos**: son combinaciones de nanopartículas con otros materiales de mayor tamaño. Se hace para mejorar las propiedades de los productos originales por separado (conseguir una mayor resistencia mecánica, resistencia a la corrosión, mayor rigidez, dureza, menor peso...).

1.1.3. APLICACIÓN EN LOS PRODUCTOS DE CONSUMO

Las aplicaciones potenciales de los NMs son innumerables, aportando propiedades con gran valor añadido al ser incorporados en los bienes de consumo. Por ello a nivel global se ha incrementado el uso de NMs manufacturados, en la que se destaca la industria de la construcción, metalmecánica, cosméticos y revestimientos.

En 2010, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), presentó una base de datos de NMs manufacturados con el objeto de revisar y promover investigaciones sobre los aspectos ambientales, de salud y seguridad. En esta base de datos se presenta un inventario de NMs que actualmente son usados comercialmente, o están siendo producidos en cantidades significativas para la investigación y aplicaciones en la industria (4).

Así mismo, en 2014, se publica un inventario que recoge los datos de los productos de consumo que incorporan la nanotecnología en su composición y sitúa su número en 1.814 manufacturados por 622 compañías en 32 países. De estos productos, sólo el 47% indica la incorporación de al menos un NM en su composición, la mayoría de ellos (42%) en la categoría de salud y belleza. El NM más utilizado son las NPs de plata (24% de los productos) si bien esta cifra que debe ser revisada, dado que el 49% de los productos no reporta el tipo de NM utilizado en su composición.

Por otra parte, *Nanowerk Nanomaterial Database™*, una base datos de acceso libre para la comunidad de la nanotecnología, reporta 2.515 nanomateriales registrados, de los cuales el 52.7% corresponden a nanopartículas. De ellos el 29.9% corresponde a nanotubos, el 8.2% a grafenos y fullerenos, el 4.3% a quantum dots, el 3% a nanoalambres y el 1,9% a otros (Figura 2).

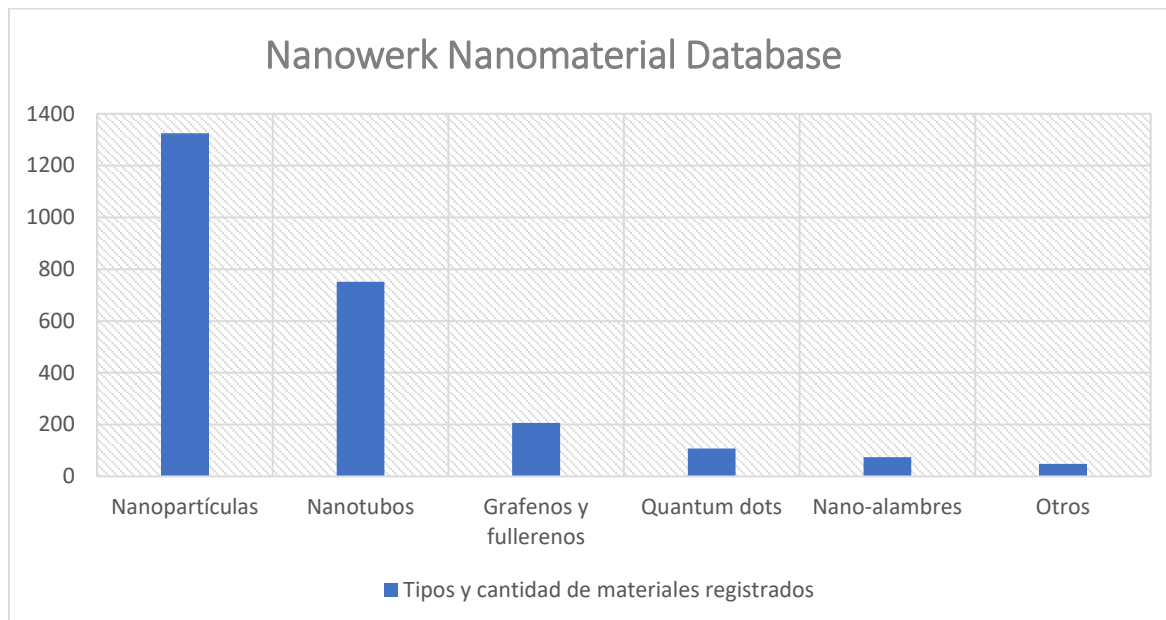


Figura 2. Distribución de los nanomateriales en Nanomaterial Database. Gráfico adaptado de Lizarazo et al (5)

En esta misma base de datos se muestra que la mayoría de los productos presentes en los productos de consumo se localizan en las categorías de "cuidado personal" y "ropa", seguidos de "artículos deportivos" y "limpieza".

Dentro de esta clasificación, la plata y el dióxido de titanio son los NMs más utilizados, aunque en casi el 60% de los productos no se pueden identificar los NMs en la base de datos (5).

1.1.3.1. Función que desempeñan

El uso de los NMs hoy en día, supone la fabricación de productos de consumo más ligeros, fuertes, limpios, menos costosos, más precisos o estéticos, más eficientes desde el punto de vista farmacéutico, mejores herramientas de diagnóstico médico y energías de producción limpia.

De manera resumida, los principales usos de estos NMs van a ser:

1. Actuar como protectores antimicrobianos (especialmente las Nanopartículas de Plata y el Dióxido de Titanio).
2. Protección ante daños ambientales como el aire y el agua mediante el recubrimiento (Dióxido de Titanio y Dióxido de Silicio).
3. Suplementos de la dieta humana (Cobalto, Calcio, Plata, Oro, Magnesio, Dióxido de Silicio o Cerámicas).

Como ejemplos, a nivel práctico, del desempeño de sus funciones se encontrarían el empleo de NPs antibacterianas de plata en las pastas dentales, las NPs de oro en suplementos alimenticios como “productos desintoxicantes” o el dióxido de titanio en los filtros solares. Los NPs de dióxido de titanio presentes en los protectores solares y los productos cosméticos son muy beneficiosos ya que ofrecen una excelente protección contra la exposición al sol, protegiendo así la piel contra los rayos ultravioleta y evitando las quemaduras solares (2).

1.1.3.2. Uso y efecto en la salud

Como ya hemos comentado, los nanomateriales van a tener múltiples aplicaciones en los bienes de consumo y a nivel industrial se encuentran en un continuo incremento de la producción. Ahora cabe destacar su papel en el ámbito médico, mostrando diversas aplicaciones en la práctica clínica, como son:

- El papel de los dendrímeros en la liberación de fármacos, sensores químicos y electrodos modificados, agentes de transfección de DNA y agentes terapéuticos en enfermedades causadas por priones.
- Los quantum dots se utilizan en aplicaciones médicas de imagen.
- Los nanomateriales de carbono forman parte de implantes protésicos.
- El cobalto es necesario en la síntesis de vitamina B12 y por ello se emplea como suplemento vitamínico (6). Sin embargo, va a ser de especial relevancia para esta revisión su presencia en las prótesis de rodilla y cadera, sobre las cuales ha surgido debate en relación a los riesgos a los que se exponen los pacientes portadores por la posible liberación de NPs desde las superficies de implantación.

Al mismo tiempo que resultan un avance y una gran herramienta en el ámbito médico, existen riesgos asociados a su presencia en la población general. La Unión Europea, a través de la Agencia Europea de Químicos (ECHA, por sus siglas en inglés) y sus programas REACH o Reglamento de la Unión Europea para protección de la Salud Humana y CLP (*Classification, Labelling and Packaging*), ha trabajado en la caracterización y registro de agentes químicos y para el manejo general de riesgos de seguridad a agentes tóxicos (7).

Sin embargo, todavía está en proceso de estudio e investigación la relación de los NMs con los nuevos riesgos ocupacionales y riesgos para los usuarios de productos nano-manufacturados.

1.2. NANOTOXICIDAD

Uno de los mayores problemas a la hora de estudiar los posibles riesgos para la salud, derivados del consumo o utilización de NMs, es que son todavía inciertos y difíciles de analizar, pues no se dispone todavía de la información necesaria. En el etiquetado de los productos de consumo no se suele incluir el tamaño de los NMs

empleados y por tanto muchos de los riesgos potenciales siguen siendo desconocidos o pasan desapercibidos.

El riesgo va a depender de múltiples factores como la composición química, la forma, el envejecimiento de las partículas e incluso su vía de entrada en el organismo, siendo el tamaño el factor clave en la toxicidad de las NPs o nanotoxicidad. Las propiedades cuánticas que poseen estas partículas a nivel de nanoescala las hacen impredecibles, pudiendo generar toxicidad; al ser más pequeñas que las propias células e incluso orgánulos celulares, son capaces de penetrar en estructuras biológicas básicas y con ello alterar su función (8).

Los posibles efectos tóxicos causados por las nanopartículas incluyen inflamación tisular y alteración del equilibrio redox hacia la oxidación, dando lugar a función celular anormal o muerte celular. Estas alteraciones tienen como consecuencias daños a niveles sistémicos así como hormonales, efectos teratógenos y genotoxicidad, entre otros (1).

Como consecuencia de este desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad de los sistemas biológicos para desintoxicar o reparar el daño resultante, se va a producir el llamado “estrés oxidativo”. El estrés oxidativo es un proceso celular normal involucrado en numerosos aspectos de la señalización celular. Diversos estudios han detectado un incremento tras la exposición a NPs, especialmente en el caso de metales, activando procesos inflamatorios y daño celular (9).

Además, la respuesta intracelular a las NPs, el grado de citotoxicidad y el posible mecanismo de toxicidad celular a las NPs también dependen del tipo de célula afectada. No todas las células del organismo van a estar expuestas de igual manera a las NPs y por ello va a depender de la vía de entrada de los productos que las contienen en el organismo. Así, la exposición puede ocurrir a través de mecanismos como la inhalación, la ingestión y la exposición dérmica, por lo que las células más afectadas se localizarán en los pulmones, la piel y el tracto gastrointestinal. Recientemente ha surgido la evidencia acerca de la exposición interna a NPs en el ser humano, como consecuencia de procesos de desgaste en implantes protésicos, generando una exposición continua *in situ*. La siguiente figura (Figura 3) refleja de forma esquemática estas posibles vías de exposición a nanopartículas.

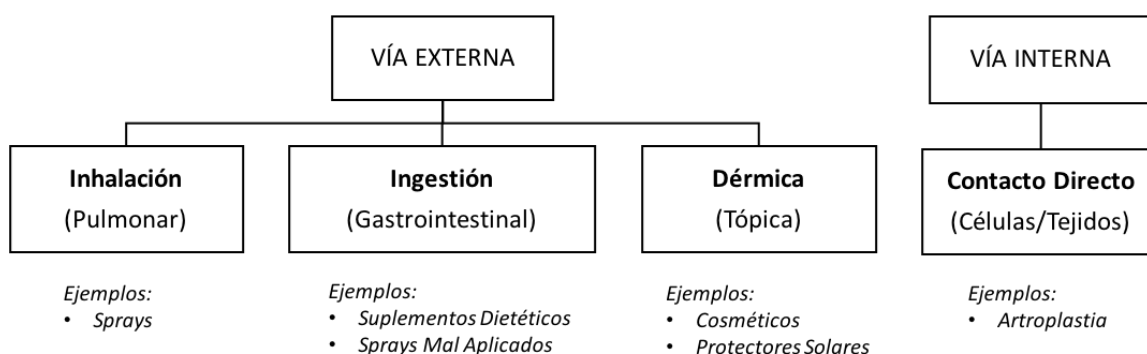


Figura 3. Vías de exposición a NPs. Esquema adaptado de Armstead et al (2)

La ruta de exposición determina en última instancia con qué sistema corporal o tejidos específicos interactúan las NPs, lo que a su vez determina los efectos secundarios, como la toxicidad o las alteraciones en la función fisiológica. Dentro de los productos de consumo, el 58% van a incorporarse por vía tópica o interactuar con la misma, principalmente porque estos productos suelen ser productos de cuidado y belleza como cremas o champús. Por vía inhalatoria se incorporarían el 25% los estos productos de consumo durante su empleo (sprays) y el 17% restante serán ingeridos de manera directa al tratarse de suplementos alimenticios, o indirecta durante la aplicación de sprays (10).

Los efectos de la exposición a NPs pueden dividirse en categorías primarias y secundarias (Figura 4), dependiendo del grado de exposición. Los efectos primarios resultantes del contacto directo entre las NPs y los tejidos celulares pueden incluir toxicidad, estrés oxidativo, daño en el DNA e inflamación. Los efectos secundarios pueden incluir toxicidad en el lugar de depósito de las NPs (órganos como el hígado, el bazo o los riñones), la estimulación de la inflamación sistémica o las alteraciones de la función a nivel general.

Inicialmente las NPs pueden tener efectos primarios al interactuar con las células, como ya hemos dicho, pero debido a su pequeño tamaño, también pueden translocarse a través de las barreras de los tejidos hacia la sangre, siendo capaces de circular y eventualmente depositarse en otros órganos y generar así una exposición secundaria a las NPs (Figura 4).

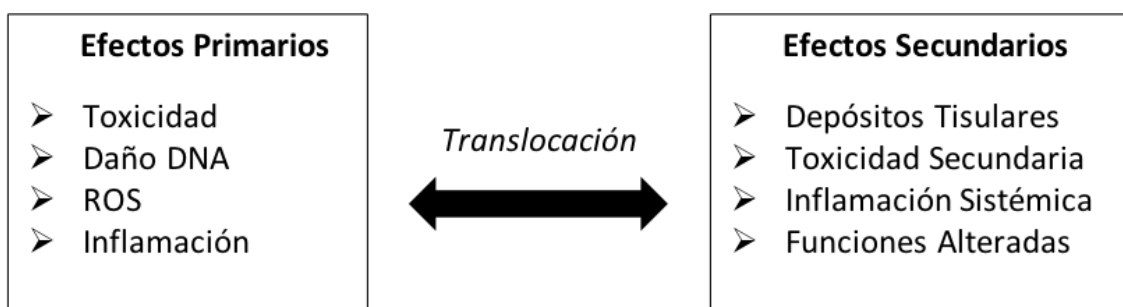


Figura 4. Efectos potenciales a la exposición a NPs. Esquema adaptado de Armstead et al (2)

El daño oxidativo e inflamación del sistema respiratorio van a ser especialmente relevantes, pues a través de la inhalación de NPs en cantidades no excesivamente importantes, son capaces de producir efectos tóxicos e incluso pasar al torrente circulatorio, cruzar la barrera hematoencefálica y afectar otros órganos como los del sistema nervioso (1).

La interacción entre los NMs con los tejidos biológicos requiere una vigilancia sobre los posibles efectos genotóxicos y carcinogénicos en los seres humanos, procurando una identificación precoz de los peligros o la evaluación de sus riesgos (11).

1.2.1. GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENESIS

La **genotoxicidad** inducida por NMs es un proceso desencadenado por la afectación de numerosas vías intra y extracelulares, que de manera resumida se

centraría en la interacción directa con el DNA y la producción de ROS. El aumento de ROS induce un estrés oxidativo capaz de dañar el DNA, proteínas y lípidos. La acumulación de daño en el material genético y daños en el huso mitótico y sus componentes, pueden desencadenar un proceso de **carcinogénesis** mediante la activación de vías de señalización celular asociadas la regulación del crecimiento celular, además de efectos reproductivos si se ve comprometido el DNA de células germinales (Figura 5).

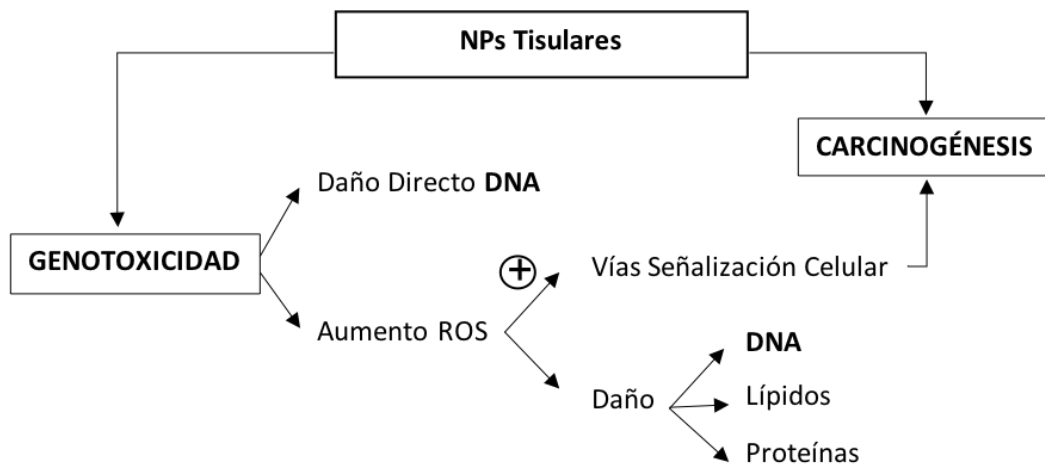


Figura 5. Genotoxicidad y carcinogénesis en la exposición a NPs en los tejidos

De esta forma, la generación de especies oxidativas por parte de los NMs conduce a un aumento de la inflamación y aumento de la producción de antioxidantes. La activación de los macrófagos conduce a la modulación en la concentración de calcio intracelular que, a su vez, activa aún más la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que, a su vez, mejora la señalización de calcio por oxidación de las bombas de calcio en el retículo endoplásmico, que conduce al agotamiento del calcio. La modulación intracelular del calcio da como resultado una motilidad deteriorada y una fagocitosis por macrófagos reducida (8). Es probable que las NPs no fagocitadas accedan e interactúen con las células epiteliales, aumentando así la inflamación. Finalmente, la interacción de las NPs con las células puede conducir a modificaciones en el DNA, lesiones celulares y aparición de diversas enfermedades (12).

El potencial genotóxico de los NMs no es concluyente hasta la fecha ya que los resultados de las pruebas *in vitro* e *in vivo* parecen depender no solo del material probado, si no del diseño experimental, incluyendo el sistema de ensayo y la vía de exposición, la concentración administrada y el punto final de la evaluación (1).

Los efectos genotóxicos pueden derivar de las interacciones directas con el DNA después de la internalización en las células, que se define como *genotoxicidad directa*, o por la capacidad de las partículas para inducir una reacción inflamatoria y para generar un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), es decir, *genotoxicidad indirecta* (Figura 6). Las rutas de entrada al interior celular van a depender de las características fisicoquímicas de las NPs, principalmente de su tamaño y polaridad. Así, las NPs más pequeñas podrán atravesar directamente la membrana celular por difusión. El segundo mecanismo de entrada al citoplasma sería mediante la formación de vesículas por parte de la membrana celular, que engloben las NPs, es decir, por endocitosis. Cuando las NPs

no puedan ser internalizadas a través de estas vías, existirán mecanismos más específicos como los canales o transportadores de membrana. Todas estas rutas van a permitir la entrada de las NPs al citoplasma, y con ello comenzaría a desencadenarse su potencial genotóxico siguiendo dos vías. Primero, parte de las NPs liberadas al medio pueden actuar dañando directamente el DNA; estas NPs pasan del citoplasma al núcleo a través de los poros nucleares y una vez en su interior, interaccionan con las bases de los nucleótidos, produciendo el fenómeno de *genotoxicidad directa*. La segunda vía sería a través de la interacción con el medio, bien teniendo lugar reacciones químicas en el citoplasma que induzcan la formación de ROS, o bien a través de las mitocondrias, interrumpiendo el proceso de la cadena respiratoria mitocondrial y la síntesis de ATP, que provoca la aparición de ROS. Esta segunda vía de *genotoxicidad indirecta*, se denomina así por terminar generando un exceso de ROS, capaces de crear un ambiente de estrés oxidativo e inflamación que puede dañar de manera indirecta el DNA (13).

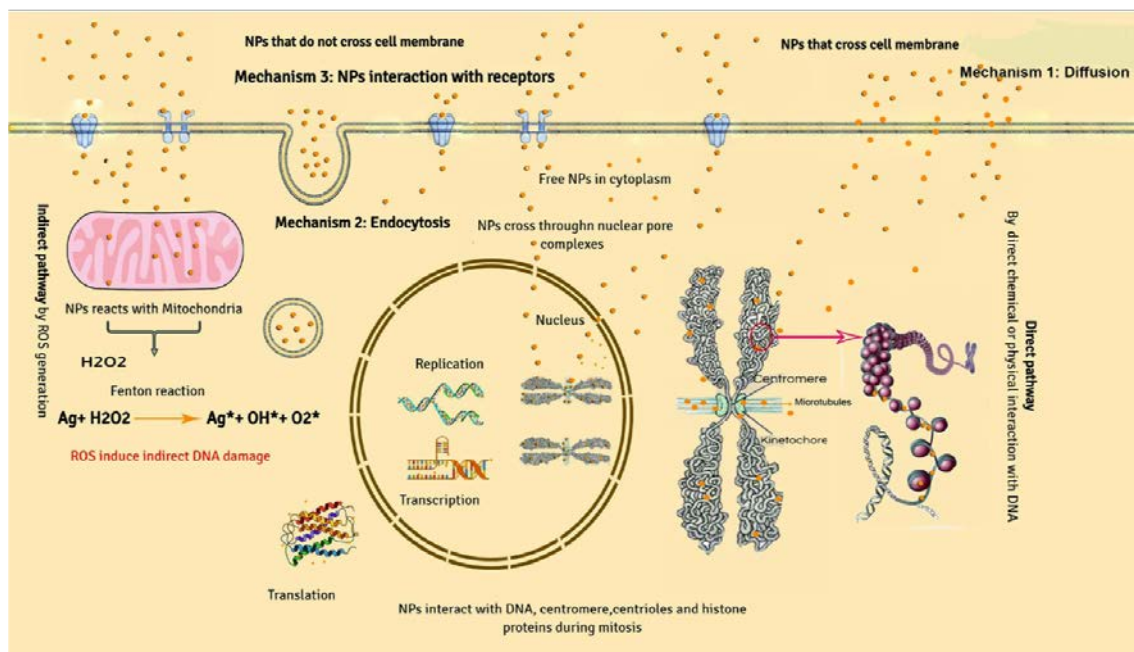


Figura 6. Rutas de entrada de las NPs al interior celular: vía directa e indirecta de genotoxicidad. Imagen tomada de Karami et al (13)

Por lo tanto, podemos decir que los efectos genotóxicos pueden ser producidos tanto por la interacción directa de las NPs con el material genético como por un mecanismo indirecto al inducir la formación de ROS, que acompañado con la biopersistencia de estos NMs puede alterar las funciones celulares y predisponer a las células a fenómenos de apoptosis y crecimiento celular anómalo. De igual forma un proceso continuado de estrés oxidativo puede alterar la maquinaria de reparación del DNA, causar mutaciones, y cambiar el patrón de crecimiento y expresión de genes, la interacción de las NPs generaría inestabilidad genómica a través de mecanismos epigenéticos.

1.2.2. EFECTOS SOBRE LA SALUD

Las mismas propiedades únicas y beneficiosas que convierten a las NPs en materiales tecnológicamente potentes también pueden poner en peligro la salud

humana, debido a su capacidad de inducir efectos citotóxicos, mutágenos, pulmonares, dermatológicos, músculo esqueléticos, neurológicos y reproductivos, además de causar cáncer y otros tipos de procesos inflamatorios (14).

La preocupación sobre la peligrosidad de los NMs se deriva del conocimiento de los efectos respiratorios y cardiovasculares (Figura 7) de los contaminantes atmosféricos ultrafinos; la experiencia industrial de los efectos sobre la salud de los humos de soldadura y de las partículas del diésel, incluida la fiebre por humos metálicos; la inflamación pulmonar aguda por sílice; y diversos estudios en animales que muestran la transferencia de nanopartículas de oro desde la mucosa nasal hasta el cerebro y los efectos respiratorios debidos al zinc ultrafino (15).

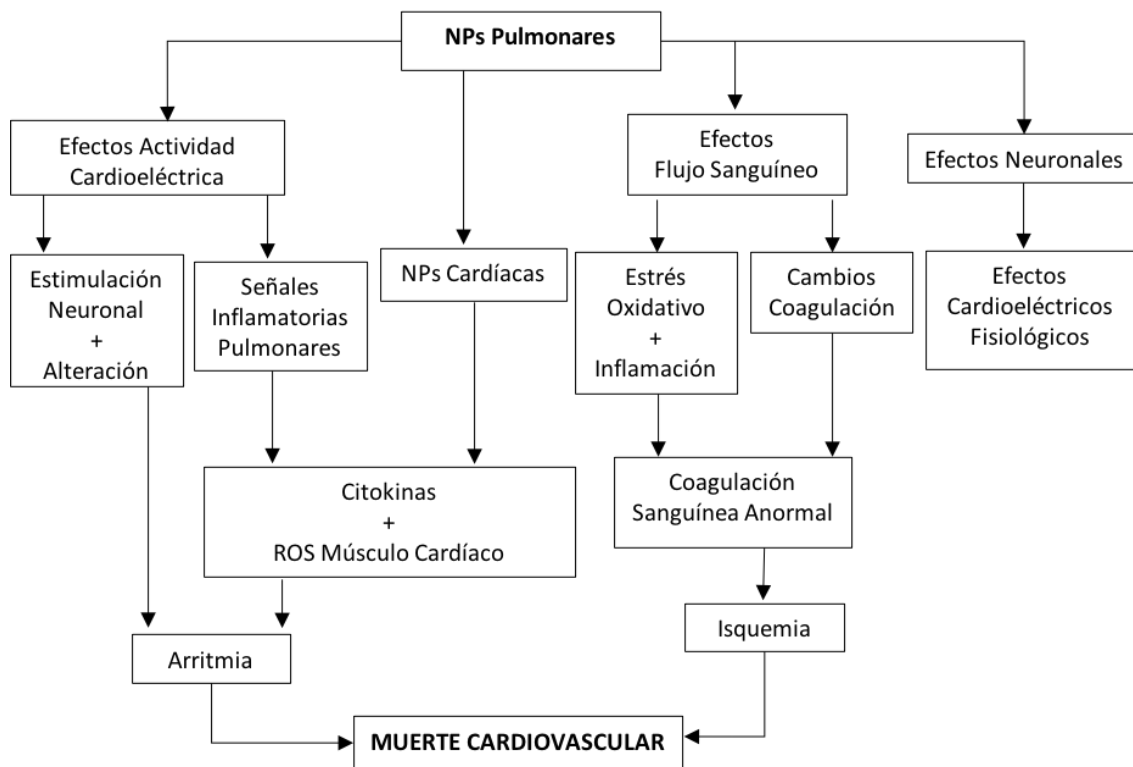


Figura 7. Mecanismos de afectación pulmonar y efectos cardiovasculares por las nanopartículas. Traducido de Buzzea et al (8)

Basándonos en la composición química de los NMs y los aspectos definidos en la Figura 5, establecemos una relación “nanomaterial-efecto” sobre la salud en el ser humano. Estos efectos van a estar centrados en estudios sobre enfermedades ocupacionales, pues han demostrado tener una mayor incidencia en la población. En relación a la toxicología de los NMs se han realizado investigaciones sobre:

- Tumores pulmonares producidos por TiO_2 (16).
- El desplazamiento y la reubicación de las nanopartículas desde los pulmones (17).
- La producción de fibrosis por inhalación por nanotubos de carbono (18).
- Los efectos cardiovasculares por inhalación de nanotubos de carbono (19).
- La producción de mesoteliomas producidos por nanotubos de carbono (20).
- La inducción de biomarcadores de inflamación por nanotubos de carbono (21).

Posteriormente en esta revisión trataremos la capacidad genotóxica y carcinogénica del cobalto en base a estudios realizados *in vitro* e *in vivo*, además de su afectación en paciente portadores de prótesis de cadera.

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta revisión bibliografía es conocer el estado actual de la genotoxicidad y carcinogénesis producida por nanopartículas, y su aplicación a los productos de desgaste generados en las prótesis de cadera MoM con aleaciones Cr-Co.

3. METODOLOGÍA

Se ha realizado una búsqueda informática de artículos científicos en distintas bases de datos (PubMed, UpToDate y Google Académico) relacionados con las nanopartículas (especialmente aquellos centrados en el cobalto) y sus efectos adversos en la salud, haciendo hincapié en la nanotoxicidad en prótesis de cadera.

En dichas bases de datos se llevó a cabo la búsqueda de artículos científicos mediante diferentes palabras clave, tanto en castellano como en inglés, las cuales se combinaron entre sí mediante la conjunción “y” (o “and” en idioma inglés):

- ADN (*DNA*)
- Nanotoxicidad (*Nanotoxicity*)
- Nanopartículas (*Nanoparticles*)
- Nanomateriales (*Nanomaterials*)
- Nanopartículas de Cobalto (*Cobalt Nanoparticles*)
- Genotoxicidad (*Genotoxicity*)
- Carcinogénesis (*Carcinogenesis*)
- Prótesis total de cadera (*Total Hip Replacement*)
- Artroplastia (*Arthroplasty*)

Una vez finalizada la búsqueda se desecharon los documentos que no guardaban relación con el tema tratado en esta revisión o cuya información no fue considerada relevante, los publicados con más de 25 años de antigüedad y los que estuvieran publicados en otro idioma diferente al castellano, inglés o italiano.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. LA PRÓTESIS DE CADERA

La artroplastia de cadera es un procedimiento ortopédico que involucra la extracción total o parcial de la articulación de la cadera dañada, siendo sustituida por un implante protésico. Se trata de un procedimiento reconstructivo que ha mejorado el manejo de aquellas enfermedades de la articulación de la cadera que no han respondido correctamente a la terapia médica convencional (22).

Esta intervención fue llevada a cabo por primera vez en 1840 en Nueva York, por el Dr. Carnochan, aunque las primeras prótesis datan de los años 600-1000 a.c. en los que se empleaban materiales rudimentarios como la madera o el cuero (23). A nivel mundial, se estima la existencia de más de cincuenta millones de personas portadoras de algún tipo de prótesis. En Europa la tasa de portadores de colocación de artroplastias de cadera al año ronda las 550.000, mientras que en España serían 35.000 y de rodilla en torno a 20.000 (24). En los últimos tiempos esta evolución ha sido exponencial dado el aumento de la esperanza de vida en la población, que sumado al desarrollo de las técnicas quirúrgicas y el deseo de mejorar la calidad de vida de los pacientes, se ha perfeccionado el uso de estos dispositivos y sus características.

4.1.2. TIPOS

La artroplastia de cadera se compone por un vástago que une la prótesis al fémur; un cotilo fijo en el acetábulo que une el implante a la pelvis y dos componentes que articulan entre sí: la cabeza femoral y el inserto acetabular (Figura 8). Dependiendo del tipo de artroplastia que se realice, será necesaria o no la utilización de todas las piezas.

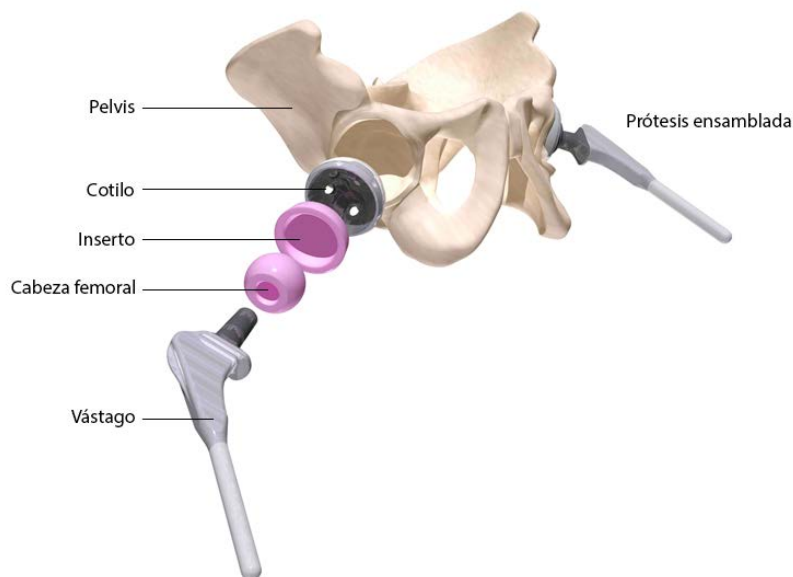


Figura 8. Partes de la prótesis de cadera, diferenciadas en el esquema de la artroplastia total de cadera

Existen diversos tipos de prótesis de cadera de acuerdo a los materiales empleados en su fabricación y la funcionalidad que vayan a presentar, de tal manera que el cirujano ortopédico decidirá qué prótesis utilizar adaptándose a las necesidades de cada paciente. Según como se lleve a cabo la sustitución de los huesos afectados, se dividen en:

- **Prótesis total de cadera (THA):** se basa en sustituir por completo la articulación de la cadera con un implante protésico, incluyendo tanto el acetábulo como el fémur (sería el ejemplo de la Figura 8). Las prótesis totales de cadera suelen usarse en los casos de artrosis o desgaste articular.
- **Prótesis parcial de cadera:** Al igual que en la prótesis total de cadera, se fija al fémur mediante un vástago, sin embargo, la cabeza femoral es de mayor tamaño y no tiene componente en la pelvis, es decir, se reemplaza solo la parte femoral. Este tipo de prótesis de cadera se suele utilizar en aquellos pacientes que presentan fracturas de cadera mayores con poca demanda funcional, pues la cirugía es menos agresiva.
- **Prótesis de revisión:** Puede ser total o parcial. Son prótesis que se utilizan para reemplazar una ya existente y que deben cambiarse por presentar algún problema como desgaste o fallo del material.
- **Prótesis de resuperficialización (HRA):** Consisten en la sustitución de la zona superficial de la cabeza femoral mediante la implantación de un componente a modo de copa, el cotilo. Sin embargo, algunos modelos han presentado problemas de durabilidad y hoy en día es más habitual el uso de prótesis totales con vástagos más cortos que los convencionales.

Existen una serie de factores que influyen en el comportamiento de las prótesis a lo largo del tiempo y la tasa de desgaste de los materiales, como la rugosidad, geometría de superficies, esfericidad o composición de la aleación metálica. Según los materiales empleados en la prótesis de cadera se clasifican en:

- **Metal sobre Polietileno (MoP):** La cabeza femoral es metálica y el inserto acetabular de polietileno (plástico sin metal de alta calidad) (Figura 9). Es el que lleva más años en el mercado desde su auge en los años 60 (25).



Figura 9. Artroplastia Metal sobre Polietileno (MoP)

- **Metal sobre Metal (MoM):** se compone de una cabeza femoral metálica en contacto con el inserto acetabular, también de metal (Figura 10). Los componentes metálicos pueden ser una combinación de metales como el titanio, aleaciones de cobalto-cromo o metales mixtos de cobalto.



Figura 10. Artroplastia Metal sobre Metal (MoM)

- **Cerámica sobre Cerámica (CoC), Cerámica sobre Polietileno (CoP) y Cerámica sobre Metal (CoM):** La cabeza femoral es cerámica y los insertos acetabulares cerámicos, de polietileno o metal. Las caderas de cerámica son menos comunes, pues, aunque las piezas de cerámica son duraderas, históricamente, han sido más frágiles que los componentes metálicos y presentan un mayor coste.

4.1.2. PRÓTESIS UTILIZADAS EN ARTROPLASTIA TOTAL DE CADERA

La cirugía de reemplazo total de cadera (THR) o artroplastia total de cadera (THA), es una intervención quirúrgica en la cual se reemplaza la articulación de la cadera por un implante protésico. Esta cirugía se ha convertido en una rutina con tasa mínima de complicaciones tempranas, ofreciendo a los pacientes un gran alivio del dolor cuando los medicamentos fallan. Además, ofrece una tremenda mejora en la función y restauración de la movilidad y, con ello, de la calidad de vida. En consecuencia, se realiza como solución a diversos procesos degenerativos y traumáticos que afectan a la articulación de la cadera, siendo la intervención quirúrgica más exitosa en el tratamiento de la osteoartritis desde hace más de cuatro décadas (26). Sin embargo, las complicaciones relacionadas con el desgaste del implante siguen siendo una causa preocupante de falla temprana.

Actualmente, el par Metal sobre Polietileno es el “*gold-standard*” en la artroplastia total de cadera, que obtuvo popularidad en la década de los años 60 debido a los excelentes resultados clínicos en los primeros estudios de seguimiento; sin embargo, con el tiempo, se encontró que los implantes de cadera MoP tenían limitaciones con respecto a la supervivencia a largo plazo del implante como resultado de la degradación de la copa de polietileno después de varios años de uso. El principal problema que surgió con los implantes de cadera MoP fue la acumulación de partículas de desgaste de tamaño micrométrico en el líquido sinovial y los tejidos periprotésicos, lo cual se pensó que estaba asociado a procesos inflamatorios crónicos y posterior osteólisis, con aflojamiento del implante y, en algunos casos, formación de pseudo-tumor (25).

Además, como el polietileno tiene que ser bastante grueso para compensar su desgaste, las cabezas femorales son más pequeñas y el riesgo de luxación era mayor. Así, en la última década se desarrolló una nueva generación de implantes de cadera con superficie de soporte de Metal sobre Metal con la justificación de reducir las complicaciones debidas al desgaste del polietileno (27) y la dislocación de la cadera (28).

Este tipo de superficie de soporte va a ser especialmente utilizada en las artroplastias de resuperficialización de cadera MoM (MoM HRA) y las MoM de cabeza grande (MoM LHTHA); las primera han sido diseñadas con la intención de conservar al máximo el hueso femoral y obtener una mayor movilidad que la otorgada por la artroplastia total de cadera convencional (29), las segundas disminuyen la tasa de luxación de cadera al aumentar el tamaño de la cabeza femoral (>36mm de diámetro) obteniendo un mayor soporte (30).

Los datos estadísticos informan que, a nivel mundial, han sido colocadas más de 1 millón de prótesis de cadera MoM, ya sea THA o HRA, con cabezas grandes en la mayoría de los casos. En los Estados Unidos, los datos del Servicio Nacional de Pacientes Hospitalizados mostraron que 38.754 implantes (34.6%) eran de la superficie de soporte de MoM de un total de 112.095 implantes usados para artroplastia primaria de cadera desde el 1 de octubre de 2005 hasta el 31 de diciembre de 2006, excluyendo MoM HRA (31).

Estas cifras nos dan una aproximación del impacto sobre la salud que tiene esta intervención, o lo que es lo mismo, resulta de vital importancia el seguimiento del correcto funcionamiento de las artroplastias, pues los posibles fallos y reacciones adversas serían problemas tanto a nivel social como económico. Así, en estos casos sería de especial valor ampliar nuestro conocimiento para establecer el mejor manejo posible ante estos pacientes.

4.2. COMPLICACIONES EN LAS PRÓTESIS MoM

A pesar de que la tasa de supervivencia de este tipo de prótesis se sitúa en un 95% a los 10 años de su implantación, existen varios problemas que pueden suponer el fracaso de las prótesis a largo plazo como son la dificultad en la fijación de los componentes al hueso, el desgaste y los productos liberados con el desgaste.

Con el aumento de tamaño de la cabeza femoral en las LHTHA se dio la posibilidad de añadir una comunicación adicional metal-metal entre las superficies cónicas de la cabeza femoral y el cuello del vástago. Esta comunicación constaba de una manga metálica de cromo-cobalto (Cr-Co) que tenía la capacidad de adaptarse al implante. De esta manera se podía personalizar la longitud del cuello femoral, el desplazamiento y capacidad de giro siendo un gran avance hasta la fecha en cuanto a las posibilidades de las prótesis de cadera. Como esta "interfaz" proporcionaba cambios positivos en la estructura de la artroplastia, fue introducida también en los implantes de tipo no-MoM THA, que emplearían una unión modular dual Cr-Co (25).

La consecuencia no deseada de esta generación de implantes fue la aparición de reacciones inflamatorias graves de los tejidos blandos periprotésicos. En particular, se han acumulado tasas crecientes de fracaso de MoM HRA y MoM THA (32). En estos tipos

de artroplastias se generan residuos de diferentes características físico-químicas como consecuencia del desgaste (Figura 11), que pueden desembocar en el fallo de la prótesis desencadenando una respuesta inflamatoria.

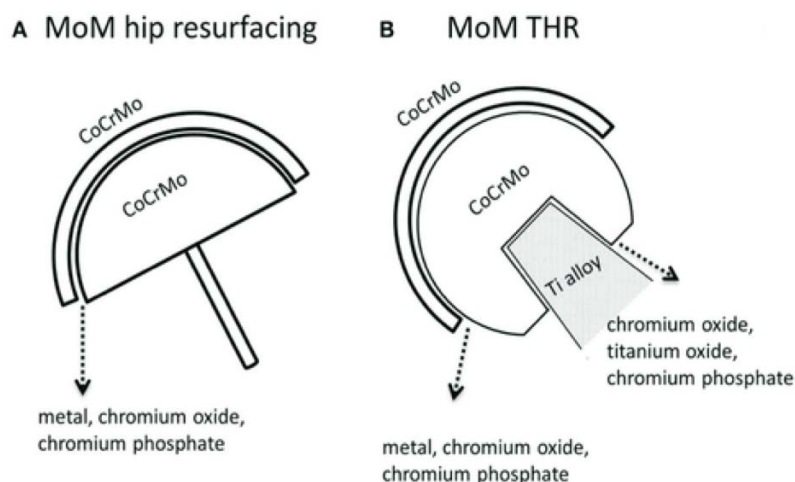


Figura 11. Artroplastia de cadera tipo MoM RHA y MoM THR liberando productos de desgaste. Imagen tomada y adaptada de Xia et al (31)

Así, el fallo de la segunda generación de artroplastias de caderas MoM se asocia con una reacción inmune en los tejidos periprotésicos, que generalmente no se observa en el metal de los implantes de MoP y que ha sido denominada como "vasculitis linfocítica aséptica y lesiones asociadas" (ALVAL) (33). Esta reacción se caracteriza por grandes acumulaciones perivasculares de linfocitos, a menudo en asociación con necrosis tisular e incluso la aparición de pseudo-tumores. Además, diversas revisiones científicas y estudios experimentales recientes han sugerido que estas reacciones no se limiten únicamente al tejido periarticular, ya que como describiremos a continuación, pueden tener la capacidad de causar efectos sistémicos en la salud de pacientes con implantes de cadera MoM; dado que este tipo de implantes libera iones metálicos que circulan a través de los fluidos biológicos, se acumulan en nódulos linfáticos, médula ósea y órganos internos, pudiendo generar otras complicaciones a nivel sistémico (25).

Este hecho es preocupante, pues los datos del *National Joint Registry for England, Wales and Northern Ireland* (NJR) indican un aumento en las tasas de revisión de los implantes de cadera MoM debido a complicaciones relacionadas con el desgaste (34). Por lo tanto, el impacto en la salud pública y en los costos de atención médica ya resultan notorios, esperándose que aumente de manera exponencial en la próxima década, dada esta alta prevalencia de pacientes portadores de este tipo de prótesis. Además, a este gasto hay que sumarle el seguimiento que requerirá el paciente durante el periodo de vida útil del implante, controlando la aparición de estos efectos adversos.

Resulta especialmente llamativo e interesante de cara a esta revisión, la detección, en mayor o menor medida, de niveles elevados de metales en sangre periférica en los pacientes con este tipo de reacciones adversas, aunque no sean específicos de estas reacciones. En consecuencia, se hipotetiza que las reacciones adversas de los tejidos a los implantes MoM son provocadas por productos de desgaste liberados en la unión protésica.

4.3. EL COBALTO EN LA SALUD: INTRODUCCIÓN A LA GENOTOXICIDAD Y CARCINOGENESIS

El cobalto (Co) es un radioisótopo comercialmente importante utilizado como marcador radioactivo, en la producción de rayos γ y en la esterilización en frío de alimentos, además en los animales forma el núcleo de la coenzima vitamina B12, un oligoelemento esencial. Los NMs de cobalto se utilizan en el campo de la medicina como instrumentos de partida para la formación de microesferas de polímeros magnéticos y el recubrimiento con dextrano (35). En medicina, este elemento ha sido conocido como un agente de contraste de resonancia magnética con muy buenos resultados, en combinación con oro, hierro, grafito y platino (36).

La exposición humana al cobalto ocurre en la industria, en el medio ambiente o tras un reemplazo articular que incluya aleaciones de Cr-Co en el implante. La exposición profesional a NPs de cobalto puede producir un riesgo de afectación pulmonar, principalmente asma, neumonitis intersticial o asma (37).

Los estudios sobre la nanotoxicidad debida a las partículas de cobalto son limitados y muy recientes, se teoriza que el principal motivo de este desconocimiento es que se dio por hecho que, como en el caso de otros metales, la actividad biológica de una partícula metálica, incluida su genotoxicidad y la carcinogenicidad, estaba mediado por la forma iónica y podía determinarse evaluando su compuesto soluble. Sin embargo, la evidencia muestra que, en contraste con lo que generalmente se piensa para la mayoría de los metales, la actividad biológica de las partículas de cobalto no está mediada exclusivamente por la forma iónica disuelta en los medios biológicos (38).

Todas estas alteraciones serán desarrolladas, con artículos ilustrativos en el siguiente apartado, pero de manera general, los efectos genotóxicos observados incluyen roturas en las cadenas de DNA, intercambios entre cromátidas hermanas y aneuploidía, transformación morfológica e interferencia con los procesos de reparación del DNA dañado (38).

En 1991 la *International Agency for Research on Cancer* (IARC) evaluó el potencial carcinogénico del cobalto y sus compuestos, concluyendo que no existían pruebas suficientes de carcinogenicidad en humanos (concretamente se estudió el cáncer de pulmón) pero sí evidencias suficientes en animales experimentales (37). Desde entonces, diversos estudios se han centrado en demostrar los efectos nanotóxicos de estas partículas, mediante estudios *in vitro* e *in vivo* con resultados muy variables, al mismo tiempo que se establece un paralelismo con los recientes fallos de las prótesis con aleaciones Cr-Co, es decir, los implantes MoM.

4.4. NANOTOXICIDAD DEL COBALTO Y SUS EFECTOS EN LA SALUD: IMPACTO EN LA ARTROPLASTIA DE CADERA

La asociación entre los productos de corrosión liberados por la artroplastia de cadera y sus posibles efectos adversos ha sido documentada en diversos artículos, los cuales exploraremos a continuación. Sin embargo, el análisis de los implantes recuperados y los informes histológicos son escasos, con solo unos pocos estudios publicados acerca de la composición de las partículas de desgaste generadas en las superficies de MoM. La principal dificultad para comprender los mecanismos de las reacciones adversas al desgaste de partículas de las interfaces metal sobre metal es que los productos de desgaste están a escala nanométrica y no pueden evaluarse adecuadamente con un examen convencional por microscopía óptica (1).

En los últimos años ha adoptado un papel importante el estudio de la posibilidad de toxicidad debida a exposición interna en los implantes quirúrgicos, concretamente en el caso de las NPs combinadas de cromo y cobalto. En estas situaciones se ha observado un desgaste por erosión en partículas de 40nm y, como consecuencia de ello, un aumento en los niveles de iones de estos metales en sangre, orina, pelo, hígado y bazo, demostrando una difusión de estos por todo el organismo. Así mismo, estos pacientes presentan alteraciones muy características, con mayores niveles de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas en linfocitos en sangre periférica (39). Además, estudios *in vitro* han demostrado que el líquido sinovial y las partículas de desgaste obtenidos de pacientes inducen roturas de doble cadena del DNA en las células de fibroblastos y daños cromosómicos en células amnióticas primarias (40). Otros estudios *in vitro*, empleando la técnica del ensayo cometa alcalino, también han demostrado que las NPs Cr-Co aumentan significativamente el daño en el DNA, incluso más que las partículas con un tamaño comprendido de micras (41).

Así, la evidencia experimental indica que las NPs de cobalto ejercen cierta actividad genotóxica y cancerígena, con una importante alteración de la respuesta inflamatoria en sistemas experimentales *in vitro*, pero existen interrogantes entorno a sus efectos reales *in vivo*.

Se han desarrollado múltiples estudios *in vitro* para demostrar la genotoxicidad inducida por las NPs de cobalto, así Ponti et al (42) utilizaron fibroblastos de ratón BALB/3T3 como medio de trabajo, demostrando en su estudio una mayor presencia de roturas en el DNA, tanto en el DNA de cadena sencilla como de cadena doble, así como aberraciones cromosómicas en forma de células micro-binucleadas tras la exposición a NPs de cobalto (>1µM). Peters et al (43) utilizaron células endoteliales humanas *in vitro* para continuar esta demostración de genotoxicidad. En su estudio analizaron una muestra de células endoteliales que presentaba alteraciones en su función, concretamente un aumento en la respuesta pro-inflamatoria y estrés oxidativo. Microscópicamente se evidenciaron depósitos de cobalto en el interior de estas células, lo que apoyaba la teoría del efecto genotóxico de las NPs de cobalto en el sistema retículo-endotelial. Todo ello sería consecuencia del tamaño nanométrico que presentan estas partículas, ya que son capaces de entrar o ser internalizadas en el interior celular, interactuando así con el DNA y desencadenando efectos genotóxicos.

Los linfocitos y los leucocitos, debido a sus funciones en la respuesta inflamatoria, tienen especial relación con el potencial genotóxico y carcinogénico de las NPs de cobalto (como veremos más adelante), característica que les ha permitido ser de gran utilidad en los distintos estudios *in vitro*. Colognato et al (44) observaron un alargamiento en la cola del DNA a través del ensayo cometa¹, así como la presencia de células micro-binucleadas mediante el test de micronúcleos² (45) sobre leucocitos periféricos, apoyando la evidencia acerca de la genotoxicidad por NPs de cobalto.

Anard et al (46) observaron que, a dosis que en principio no eran citotóxicas de NPs de cobalto, se producían roturas de cadenas o sitios lábiles en el DNA de linfocitos periféricos humanos incubados *in vitro* con cobalto. Además, estos daños podían ser “revertidos” parcialmente al eliminar el exceso de especies reactivas de oxígeno generadas durante la exposición. De Boeck et al (47) realizaron otro ensayo cometa analizando la relación dosis-efecto y la dependencia del tiempo en las roturas de DNA tras la exposición a NPs de cobalto. En este estudio *in vitro* se estableció una relación directa entre ambas variables, es decir, las roturas aumentaban con una mayor concentración de NPs de cobalto y una mayor duración de la exposición.

Entonces al efecto genotóxico debe sumarse la respuesta pro-inflamatoria inducida por las NPs de Cr-Co, que por diversas vías pueden afectar local o sistémicamente a los tejidos biológicos. Kwon et al (48) investigaron la aparición de pseudo-tumores en pacientes portadores de implantes protésicos. A través de un estudio *in vitro* observaron que las NPs de cobalto (emplearon partículas de 30-35nm) inducían citotoxicidad en macrófagos a partir de una concentración mayor de 1×10^{12} partículas/ml. Con estos datos llegaron a la conclusión de que, dada la alta concentración de NPs de cobalto necesarias para producir la citotoxicidad en los macrófagos *in vitro*, debía de existir un aumento *in vivo* en la concentración de estas NPs, y, en consecuencia, los pseudo-tumores observados en los implantes protésicos serían producidos por los macrófagos cargados de cobalto.

Así, Guildford et al (49) también investigaron la excesiva respuesta celular inflamatoria presente tras la exposición a NPs de cobalto *in vitro*. Estas NPs eran capaces de inducir a las células a adquirir un fenotipo de macrófago y así ser capaces de secretar niveles elevados de TNF α (citocina pro-inflamatoria), mediador en los procesos inflamatorios con un importante papel en la defensa contra las infecciones o lesiones tisulares. Sin embargo, Singh et al (39) demostraron, mediante otro estudio *in vitro*, que el factor de necrosis tisular alfa (TNF α) en condiciones patológicas, como sería el caso de la exposición a NPs de cobalto, es capaz de producir daño en el DNA mediante la fragmentación cromosómica, las mutaciones puntuales del DNA, la inhibición en los mecanismos de reparación del mismo o las alteraciones epigenéticas (forma patrones de metilación que alteran el perfil de expresión génica). Además, la evidencia de

¹ El ensayo cometa es un método de detección rápida de daño en el DNA, incluyendo roturas en la doble cadena, roturas un cadena o sitios lábiles, realizado sobre células *in vitro*.

² El test de micronúcleos es un ensayo *in vitro* que detecta productos químicos capaces de producir complejos DNA-membrana, como los micronúcleos que se encuentran en el citoplasma de las células interfásicas. Así, este método identifica la actividad clastogénica y aneugénica producida en las células sometidas a división celular durante o tras la exposición a la sustancia química de prueba.

investigaciones recientes como las llevadas a cabo por Waris et al (50) revelaron que el microambiente inflamatorio producido entorno a los tumores es un factor indispensable en el propio proceso neoplásico. De esta manera, estos estudios pueden apoyar no solo el efecto genotóxico de las NPs de cobalto, sino una posible relación con la carcinogénesis; al facilitar un ambiente pro-inflamatorio que provoca la aparición y la formación de tumores, lo que sería una capacidad carcinógena secundaria al ambiente inflamatorio inducido por las NPs de cobalto.

Para concluir con esta parte, se podría decir que los estudios *in vitro* demostraron que las NPs de cobalto ejercían efectos nanotóxicos, principalmente a nivel genotóxico produciendo la rotura de la cadena del DNA, un excesivo estrés oxidativo, interferencia con los mecanismos de reparación del DNA y aparecían células micro-binucleadas y aberraciones cromosómicas (aneuploidía, poliploidía y tetraploidía). También, se observó la transformación morfológica de las líneas celulares de mamíferos, favoreciendo la actividad pro-inflamatoria, que parece tener relación con los procesos tumorales, por lo que todos estos estudios han aportado evidencias clave para continuar investigando la hipótesis que indica la capacidad genotóxica y carcinogénica de las NPs de cobalto.

Sin embargo, el estudio de la carcinogénesis inducida por NPs de cobalto es muy limitado y controvertido. Diversos estudios han buscado su evidencia a través del estudio *in vivo* para demostrar la relación con los procesos tumorales en ratones expuestos a estos materiales, pero pocos han obtenido resultados concretos. Un estudio *in vivo* en ratas, Hansen et al (51) evidenciaba que las NPs de cobalto eran capaces de producir tumores mesenquimales malignos, es decir, tenían potencial carcinogénico. En este estudio se implantaron NPs de cobalto vía intramuscular en la columna vertebral de ratas para investigar si se producía carcinogénesis. En cinco de las seis ratas implantadas, se desarrollaron nódulos en los lugares de implantación, que se correspondía morfológica e histológicamente con tumores mesenquimales malignos. Posteriormente llegaron a la conclusión de que, con los datos conocidos en relación a la respuesta inflamatoria desencadenada por las NPs de cobalto y su relación con el ambiente tumoral, se podía establecer una secuencia temporal en la actividad carcinogénica de las NPs de cobalto; primero se generaría un proceso inflamatorio, seguido de “pre-neoplasia” y terminaría con la neoplasia definitiva.

Por otra parte, aunque los efectos genotóxicos de las NPs de metal de cobalto se han demostrado *in vitro* en varias especies celulares, tanto humanas como en ratones, un único estudio sobre la carcinogénesis en ratas aporta poca evidencia y no es suficiente para establecer conclusiones, solo hipótesis y un campo de estudio todavía en vías de investigación.

En esta línea de estudio, cabe destacar el trabajo de Moulin et al (52)(53), que llevaron a cabo dos estudios *in vivo* entre 1950 a 1980 con trabajadores expuestos de manera ocupacional a concentraciones elevadas de cobalto vía inhalatoria, para así intentar establecer una asociación entre exposición a NPs de cobalto y carcinogénesis. Sin embargo, este estudio de cohortes prospectivo no aportó datos concluyentes; en un primer momento parecía existir mayor incidencia de cáncer de pulmón en esta población, pero investigaciones posteriores estimaron que el número de cánceres que

habían surgido no era significativo y que no se habían tenido en cuenta otras variables que podrían haber alterado la validez de los datos, como el hábito tabáquico de los trabajadores o la exposición simultánea a otros tóxicos inhalados.

En resumen, a pesar de que existiría evidencia de carcinogénesis en los estudios realizados *in vitro* sobre fibroblastos en relación a la respuesta inflamatoria, la falta de estudios *in vivo* que certifiquen estas hipótesis hace necesaria una mayor investigación tanto a nivel de laboratorio como a nivel epidemiológico. Sería interesante, de cara al futuro, que estos estudios se centraran en pacientes portadores de implantes con aleaciones de cobalto o reemplazos de estos.

Teniendo en cuenta esta premisa, otros estudios decidieron continuar el trabajo e ir más allá investigando no solamente el efecto nanotóxico del cobalto, sino su efecto en combinación con el cromo, asociación presente como aleación en las artroplastias de cadera que hemos descrito previamente y cuya aplicación e impacto sobre la salud se ha visto incrementado en los últimos años.

Siguiendo esta línea argumental, Papageorgiou et al (41) realizó un estudio *in vitro* en el que se comparaban los efectos citotóxicos producidos sobre fibroblastos humanos ante NPs Cr-Co a dosis volumétricas. En sus resultados observó la aparición de radicales libres, daño en el DNA celular, citotoxicidad y aneuploidía. Partiendo de esta base, Tsaousi et al (54) informaron que estas NPs también aumentaban la producción de células micro-binucleadas y originaban pérdidas, ganancias o deleciones cromosómicas en los fibroblastos humanos. Este estudio fue continuado por Parry et al (55) que además de los hallazgos precedentes, vieron que se producían tetraploidías y roturas en la cadera del DNA, apoyando la hipótesis de la nanotoxicidad inducida por NPs de cobalto, a su vez comparable a las aleaciones cromo-cobalto.

Todos estos estudios observaban dichas alteraciones, pero no aportaban novedades respecto al mecanismo de producción de la genotoxicidad, por qué se producía este daño celular en los fibroblastos humanos más allá de las explicaciones conocidas hasta la fecha. Pues bien, en un estudio realizado por Bhabra et al (56) se teorizaba que las NPs de Cr-Co podían atacar el DNA celular fibroblástico mediante un mecanismo de transmisión de nucleótidos de purinas (*ATP-like*) y señalización intercelular a través de uniones tipo GAP o hemicanales y canales de panexina. Así las NPs Cr-Co eran capaces de producir daño en el DNA celular de los fibroblastos humanos a través de la barrera celular, pero sin llegar a cruzarla. Sin embargo, estas vías o mecanismos son complejos y variables, por lo que siguen siendo objeto de estudio a día de hoy.

De hecho, estas vías de entrada podrían ser resumidas, a grandes rasgos, por los hallazgos en los estudios de Brown et al (57) que buscaban analizar *in vivo* la respuesta biológica ante la exposición a NPs Cr-Co. En este ensayo se administraron inyecciones de NPs Cr-Co en ratones y se estudiaron las vías de internalización de las NPs en los distintos tipos celulares, observándose que las NPs pueden entrar directamente en cualquier célula generalmente por vía endocítica o, degradarse fuera de las mismas, liberar los iones metálicos de cobalto e introducirse al citoplasma a través de transportadores de membrana (Figura 12). Si las NPs han entrado directamente, pueden

atacar también directamente las cadenas de DNA o liberar su contenido iónico al producirse la corrosión en el citoplasma celular. Además, serían capaces de producir especies reactivas de oxígeno, con su potencial acción genotóxica. Todos estos productos acumulados en el citoplasma pueden pasar al núcleo celular y, de manera individual o combinada, provocar la rotura de la cadena del DNA.

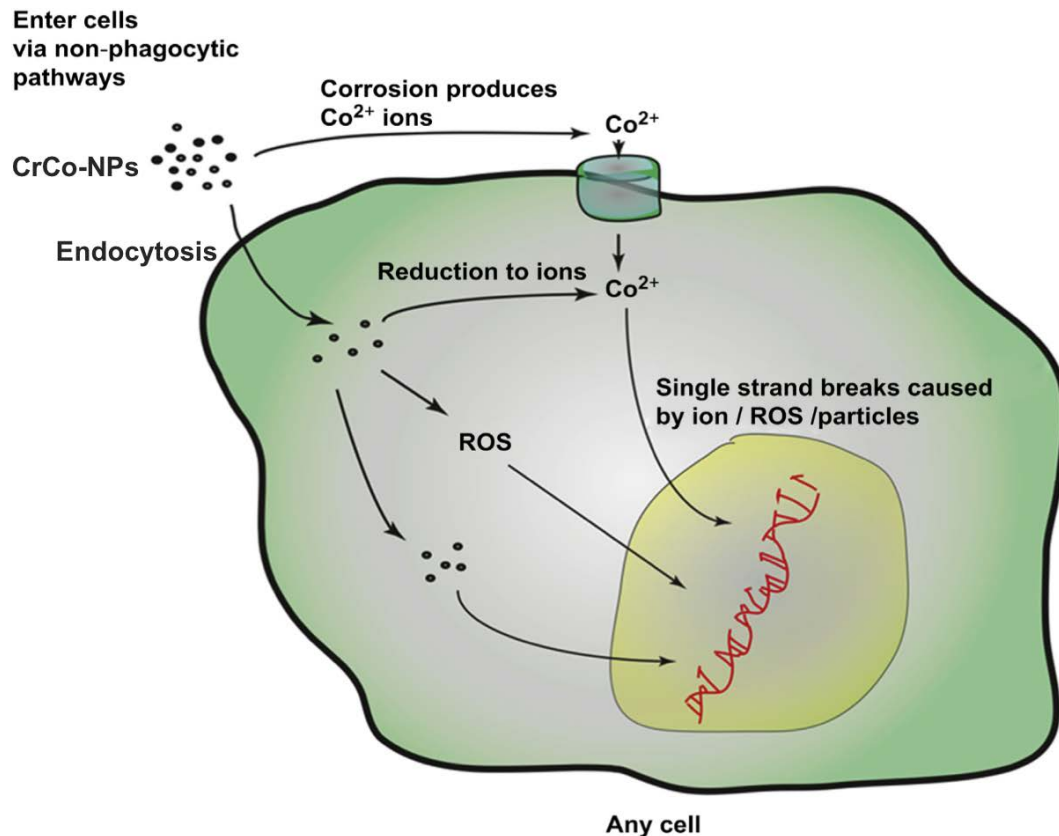


Figura 12. Vías de entrada del cobalto al interior celular y sus efectos genotóxicos. Imagen tomada y adaptada de Brown et al (57)

Aunque la genotoxicidad está relativamente explicada y se llegan a conclusiones comunes, existen a día de hoy muy pocos estudios sobre la carcinogénesis de NPs Cr-Co. Diversos estudios han comenzado a profundizar en este tema, como Lewis et al (58) que llevaron a cabo un ensayo *in vivo* en ratas F344, a las cuales se les inyectaba NPs Cr-Co (20 mg/rata) intra-articularmente, sin que aparecieran tumores localmente o a distancia pasados 24 meses del proceso. Como se puede deducir, estos estudios todavía no generan resultados favorables y se debería de continuar investigando la carcinogénesis producida por NPs de cobalto, por NPs de Cr-Co y su aplicación práctica en pacientes portadores de implantes protésicos.

En consecuencia, se podría decir que los diversos estudios mencionados demostraron la capacidad genotóxica de las NPs Cr-Co, especialmente en la línea celular fibroblástica, de manera similar a la genotoxicidad demostrada solamente por las NPs de cobalto. Esta genotoxicidad fue generada bien por factores genéticos como las aberraciones cromosómicas y el daño directo en el DNA en forma de roturas de cadena, o mediante la transmisión de nucleótidos a través de uniones tipo GAP. La mayoría de los estudios centrados en las NPs Cr-Co analizaron sus efectos sobre los fibroblastos, lo

que puede relacionarse con el aumento en la incidencia de la artroplastia total de cadera, es decir, una mayor tasa de pacientes portadores de implantes protésicos con aleaciones Cr-Co. Es por ello que el aumento en el número de casos con fallos en las prótesis de cadera y la necesidad de re-intervenir al paciente para retirar los implantes defectuosos ha propulsado los estudios en torno a la nanotoxicidad producida por los materiales fabricados con aleaciones de Cr-Co en este tipo de situaciones, especialmente la artroplastia total de cadera, que es la que presenta sobre todo este tipo de aleación.

Como ya se ha comentado existen muy pocos estudios publicados que investiguen los efectos nanotóxicos de las aleaciones Cr-Co directamente en pacientes portadores de este tipo de prótesis, pero no por ello se justifica que no se disponga de alguno que haya intentado probar esta nanotoxicidad en humanos.

Goode et al (59) partían de una serie de pacientes intervenidos de cirugía de recambio por fracaso de prótesis de cadera en los que se detectaron niveles elevados de Cr-Co en sangre con sintomatología clínica asociada. Así, analizaron la composición de las partículas de desgaste presentes en los tejidos peri-protésicos, detectándose esencialmente Cr-Co en cantidades muy superiores a las esperadas y fenómenos de estrés oxidativo y toxicidad mitocondrial en macrófagos en relación a dicha exposición (como ya se había visto en los estudios *in vitro* con esta línea celular).

Hasta el día de hoy, los posibles efectos tanto locales como sistémicos derivados de las partículas de desgaste en las artroplastias tipo MoM han sido objeto de estudio e investigación epidemiológica. A nivel local es muy importante estudiar cómo afecta a la salud ósea de los pacientes portadores, por la exposición a NPs Cr-Co. Por ello, se han realizado estudios en los que se simula el efecto crónico de esta exposición en los osteoblastos y osteoclastos humanos. Entre estos estudios se destaca a Andrews et al (60), que partía de la base de que las concentraciones de NPs Cr-Co son mayores en el suero y el fluido sinovial de los pacientes portadores de prótesis MoM. Así, realizaron un estudio *in vitro* con fibroblastos humanos que se centraba en la administración de cantidades equivalentes de estas nanopartículas, es decir, dosis suprafisiológicas. Los resultados que obtuvieron apoyaban la idea de que estos materiales producen la apoptosis de células *osteoblásticas-like*, de forma dependiente a la dosis, y suprimen la función del osteoblasto.

La supresión de la actividad osteoblástica puede explicar la pérdida aséptica temprana así como el fracaso de osteointegración primaria. Long et al (61) describió un ratio del 15% de fallo para la prótesis acetabular Durom (tipo MoM) en 207 caderas tras dos años de implantación. En todos los casos salvo en uno se produjo fallo aséptico de la prótesis y en 13 casos examinados en detalle se mostraba un fallo en la osteointegración del hueso sobre la superficie de fijación, lo que podría estar relacionado con la detección de niveles supra-fisiológicos de metales pesados (como el cromo o el cobalto). Esto produciría una activación osteoclástica (especialmente en la superficie del hueso) y consecuente estrechamiento del cuello femoral, factor contribuyente al riesgo de fractura. Así, se concluiría que las NPs de Cr-Co son capaces de afectar la salud ósea afectando a la masa ósea y la remodelación, mediante cambios en la actividad osteoblástica-osteoclástica y sobre el número celular.

Sin embargo, el papel de los desechos producidos por el desgaste y la liberación de NPs metálicas como factores que contribuyen a las reacciones de hipersensibilidad y las posibles respuestas locales del tejido perióstico en estos pacientes sigue sin estar claro. Por ejemplo, Matthies et al (62) concluyeron que los pseudo-tumores que aparecían en pacientes con prótesis MoM eran independientes de la tasa de desgaste, es decir, con niveles mínimos de Cr-Co seguían manifestándose clínicamente, sugiriendo la individualización del paciente como factor de susceptibilidad. Huber et al (63) analizaron muestras de tejido periprotésico *post-mortem* en pacientes con MoM que habían presentado poco desgaste y buenos resultados clínicos, observándose infiltraciones linfocíticas difusas y perivasculares. Anteriormente se pensaba que estos hallazgos eran producto de las NPs metálicas liberadas por el desgaste en los implantes defectuosos tipo MoM, y por lo tanto eran histológicamente característicos de este tipo de pacientes, cosa que es cierta, pero no de manera exclusiva, es decir, estos hallazgos pueden aparecer con o sin la liberación de altas concentraciones de NPs Cr-Co.

Por tanto, en ensayos *in vivo* con pacientes portadores de artroplastias totales de cadera MoM no fue evidente la correlación entre la concentración de partículas de desgaste en el tejido y la extensión de las reacciones locales.

Estas reacciones locales no serían los únicos efectos posibles de la exposición a NPs Cr-Co, pues artículos de revisión como Gill et al (64), Polyzois et al (65) o Keegan et al (66) han postulado que las NPs liberadas por los implantes MoM pueden ser capaces de distribuirse fuera del área local, y, por tanto, sería razonable pensar en los diversos órganos afectados y sus repercusiones sistémicas.

En 2006, Catelas et al (67) publicaron un estudio sobre la distribución sistémica en un paciente fallecido tras haber sido portador de un implante MoM normofuncionante durante 29 años. Analizando el tejido perióstico *post-mortem*, observaron la presencia de partículas densas y oscuras en las muestras de tejido extraídas del hígado, bazo y ganglios linfáticos, sospechando que podrían tratarse de depósitos de Cr-Co. Aunque no parecía que existieran necrosis o cambios patológicos, un análisis adicional determinó que estas partículas contenían principalmente silicatos de origen ambiental, y en menor cantidad, restos de aluminio, titanio, potasio o magnesio. De todas las partículas estudiadas, ninguna fue identificada como parte de la aleación Cr-Co, a excepción de una que se encontraba agrupada, la cual también estaba presente en las células fagocíticas del hígado.

En contra del planteamiento inicial, los autores concluyeron que no existía evidencia de daño orgánico en estos tejidos tras casi treinta años de exposición a partículas e iones metálicos; los elementos encontrados se correspondían con la composición del polvo inhalado, normalmente presentes al analizar los ganglios linfáticos hiliares de pacientes sin implantes, lo que viene a decir que sería necesario continuar los estudios y analizar la composición química de las partículas metálicas encontradas en estos tejidos para poder afirmar si proceden de la exposición ambiental o se han originado en el implante. Así, su estudio no pudo confirmar que la distribución sistémica de partículas metálicas fuese producida por la exposición a la aleación Cr-Co en el implante protésico, pero tampoco pudo descartarlo.

Por otro lado, sí se ha visto distribución de partículas de desgaste a los órganos distales en pacientes con prótesis no-MoM, pero sin que exista una afectación patológica de relevancia. Dos de los artículos más importantes en el ámbito científico sobre este tipo de distribución sistémica por parte de las NPs metálicas en portadores de artroplastia de cadera han sido Case et al (68) y Urban et al (69). Sus estudios se basaron casi en su totalidad en implantes no MoM (MoP y otros). Esta revisión se centra en las prótesis tipo MoM porque epidemiológicamente han presentados más tasas de fallo y recambio, que se ha postulado como consecuencia de la nanotoxicidad de la aleación Cr-Co presente en este tipo de prótesis. Sin embargo, la unión Cr-Co no es exclusiva de este tipo de implantes, como ya explicamos previamente, y cito, *“fue introducida también en los implantes no-MoM THA, que emplearían una unión modular dual Cr-Co (25)”*. A continuación repasaremos los hallazgos más relevantes de dichos estudios.

Case et al (68) investigaron la presencia de NPs metálicas en los ganglios linfáticos locales y periféricos, la médula ósea, el hígado y el bazo de pacientes portadores de implantes no-MoM, sin mayor afectación de los tejidos pulmonares o renales. Estas partículas estaban especialmente concentradas en el interior de los macrófagos localizados en los ganglios linfáticos ilíacos, que son los más próximos al implante; por otro lado, los ganglios paraórticos presentaban la concentración más baja de estas NPs, al estar más alejados de la prótesis.

Como ya hemos dicho, Urban et al (69) también realizaron un análisis con implantes de MoP recogidos durante la autopsia de un paciente portador, en el cual se estudiaba la concentración de NPs en los órganos. El 38% de estos pacientes mostraban partículas metálicas en el hígado o en el bazo, mientras que un 68% de los casos estudiados tenían concentraciones supra-fisiológicas metálicas en los ganglios linfáticos. Uno de los hallazgos más relevantes de este estudio fue que estas nanopartículas aumentaban tras la reintervención de los pacientes por fallo mecánico, especialmente en el hígado y el bazo.

A pesar de que ambos estudios demostraban la presencia de nanopartículas Cr-Co en órganos distantes al lugar de colocación protésica, en la mayoría de los casos, las concentraciones de partículas de desgaste no fueron lo suficientemente elevadas como para ser consideradas causantes de sintomatología importante y, diversos artículos han puesto en duda los hallazgos de estos estudios. Jacobs et al (70) concluyeron que "las implicaciones clínicas de la distribución sistémica de las nanopartículas en los implantes siguen sin estar claras" y "será necesario realizar estudios epidemiológicos comparativos para aclarar los efectos toxicológicos, si los hay, de la distribución sistémica de nanopartículas metálicas en los de implantes".

Como resumen de estos apartados; existe distribución sistémica de las NPs Cr-Co, pero ha sido especialmente estudiada en implantes no-MoM, por lo que su aplicación en otro tipo de prótesis es dudosa y, a día de hoy, no existe una correlación evidente entre concentración de partículas en los órganos distales y manifestaciones patológicas.

Que en su momento esta asociación no fuese evidenciada y apoyada por mayores investigaciones, no excluye su importancia como avance en la posible implicación nanotóxica sistémica de las NPs Cr-Co en los pacientes con artroplastia de cadera, especialmente las de tipo MoM. Teóricamente, las NPs podrían internalizarse en cualquier tipo celular, y de ahí que sus posibilidades patológicas podrían ser inmensas, más allá de la afectación ósea o de las reacciones locales descritas previamente.

Partiendo de esta base y con el paso de los años, diversos estudios han apoyado la toxicidad sistémica por Cr-Co en pacientes con prótesis de cadera, dado el sospechoso aumento de casos de intoxicaciones por NPs metálicas (especialmente por cobalto) en pacientes portadores de implantes protésicos. Así, Bradberry et al (71) publicaron un artículo de revisión sobre toxicidad sistémica en portadores de prótesis; mediante la búsqueda en distintas bases de datos observaron la existencia de 26 documentos en los cuales se describían un total de 18 casos individuales de pacientes portadores de implantes protésicos con toxicidad sistémica, siendo 8 de ellos artroplastias tipo MoM. En estos pacientes la toxicidad sistémica fue apareciendo meses e incluso años después de la colocación de la prótesis metálica, siendo lo más característico: neurotoxicidad, cardiotoxicidad y toxicidad tiroidea. La neurotoxicidad se manifestó como neuropatía periférica (8 casos), hipoacusia neurosensorial (7 casos) y deterioro cognitivo (5 casos). Todas estas características neurológicas, a excepción del deterioro cognitivo, se han asociado previamente con la intoxicación por cobalto.

La neurotoxicidad por cobalto ha sido descrita en casos de exposición ocupacional o por sobredosis en el tratamiento de la anemia refractaria. Su distribución corporal se ve influenciada por la unión a proteínas plasmáticas, concretamente la albúmina, que actúa como transportador fisiológico de sus iones. La acidosis, la reducción de la tensión de oxígeno y la generación de radicales libres pueden alterar el lugar de unión de albumina, produciendo intoxicaciones por cobalto en tales circunstancias.

Los metales no unidos a proteínas son capaces de introducirse en las células mediante un transportador de metales, DMT1 (transportador divalente de metales 1), que es conocido por ser un transportador activo de Fe, Zn, Mn, Co, Cd, Cu y Pb mediante un mecanismo acoplado a protones. DMT1 presenta 12 segmentos transmembrana y se expresa en neuronas, permitiendo la incorporación de metales desde el medio extracelular y/o desde endosomas reciclados. De esta manera, en los pacientes portadores de implantes protésicos puede producirse una liberación constante de Cr-Co, que a su vez interactúa con la unión a albúmina mediante la formación de radicales libres, aumentando así la fracción libre de estos metales en suero y con ello favoreciendo su entrada en el interior celular, produciendo efectos tóxicos sistémicos.

La intoxicación por Co en pacientes portadores de prótesis articulares ha originado alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) con desenlace de una afectación moderada sensoriomotora con ceguera total, sordera y postración por debilidad motora severa en extremidades (72). La medición de niveles de cobalto en matrices biológicas y la unión a proteínas puede ser útil para conocer los efectos y la variabilidad en su capacidad tóxica.

El campo de investigación sobre esta materia es amplio y cada vez más diverso, como ya hemos dicho, los potenciales efectos sistémicos son inmensos y el interés entorno a los efectos que realmente son producidos por esta nanotoxicidad está aumentando, hasta tal nivel que recientemente ha sido publicado el primer artículo que introduce una serie de casos con alteraciones neuropsiquiátricas en relación a nanotoxicidad sistémica en pacientes con prótesis de cadera. Green et al (73) siguieron a diez pacientes (varones de 60 años) con fallos en su prótesis de cadera y niveles tóxicos de cromo y cobalto en suero que estaban a la espera de pasar de nuevo por el quirófano para ser reintervenidos y reemplazar la prótesis defectuosa. Previamente a la cirugía, todos los pacientes fueron valorados por psiquiatría, determinando que 9 de los 9 encuestados cumplieron con los criterios y baremos del Inventario de Depresión de Beck (BDI). De hecho 3 de estos pacientes estaban en tratamiento. Además, 7 de 9 pacientes mostraron un déficit de memoria a corto plazo con una puntuación media en el “test Mini Mental” de 24,2 (en la población normal se esperaría un resultado de 28 para ese grupo, <25 indicaría una posible demencia).

Así, los investigadores establecieron una relación entre un estado de ánimo deprimido y deterioro neurocognitivo clínicamente significativos en los pacientes tras producirse un fallo en sus prótesis de cadera MoM y toxicidad concomitante de cromo y cobalto. Cierto es que la depresión puede estar mediada por mecanismos psicológicos: el miedo a la necesidad de una cirugía adicional y los problemas continuos con dolor y movilidad son preocupaciones frecuentemente citadas. Sin embargo, las anomalías neurocognitivas podrían estar desencadenadas por daño cerebral estático causado por la toxicidad del cromo y el cobalto o podrían representar un proceso dinámico, que es una demencia de inicio temprano desencadenada por los depósitos metálicos en los tejidos. Si este último fuera el caso, podría tener implicaciones importantes, aún no reconocidas, para la salud pública.

El interés por la nanotoxicidad, especialmente del cobalto, está aumentando y con ello, como hemos visto, los estudios y artículos publicados. Aunque todavía queda un camino importante para demostrar estas asociaciones clínicas, sobre todo en los pacientes con prótesis MoM, resulta imprescindible una correcta medición de los niveles de estas nanopartículas en el organismo. Por ello, además de las pruebas de imagen correspondientes, se deberían de realizar una serie de test que procuren la medición de niveles de cobalto, no solo en suero, sino en matrices biológicas para poder conocer los efectos y la variabilidad de la toxicidad del cobalto.

4.5. PROTOCOLO DE SEGUIMIENTO EN LOS PACIENTES

Aún se desconoce la naturaleza exacta y el destino de las partículas metálicas de desgaste y su correlación clínica, junto con efectos locales o sistémicos que puedan producirse a corto o largo plazo: reacciones inflamatorias, pérdida de masa ósea (osteolisis), reacciones de hipersensibilidad, riesgo de mutagénesis, carcinogénesis y toxicidad. Diversas sociedades han puesto de manifiesto la importancia de categorizar el riesgo de los pacientes portadores de este tipo de dispositivos mediante la medición de los niveles sistémicos de iones metálicos de cromo y cobalto, que refleje el desgaste que está sufriendo esa prótesis. En consecuencia, desde 2010 (74) se llevan a cabo

controles de rutina en la práctica clínica de los pacientes con prótesis de cadera MoM, que se basa en el análisis de la concentración de estas sustancias en sangre (Figura 13).



Figura 13. Muestras de suero y sangre pre-análisis

Como se ha explicado anteriormente, las prótesis metálicas en contacto con los fluidos corporales liberan partículas e iones que, a través del torrente circulatorio, alcanzan distintos órganos y tejidos donde se depositan y/o excretan (orina, cabello, etc.). Para intentar establecer un diagnóstico certero y ampliar el conocimiento clínico de estos productos de desgaste, sería conveniente comparar, de forma exacta y precisa, los niveles de metales en pacientes portadores de implantes y en personas no portadoras. Así, se han determinado como niveles basales en el suero de la población sana: 0,31-1,97 ppb para Cr y 0,3-1,02 ppb para Co, mientras que en orina los niveles de Cr se encuentran entre 0,04-4 ppb y 0,16-1,14 ppb para Co (75). Las concentraciones de Cr y Co en el suero y el tejido articular se relacionan con el grado de desgaste en el implante y es mayor en los pacientes con acumulación de partículas metálicas en los tejidos periprotésicos (76). Estas partículas metálicas son principalmente eliminadas vía renal, pero en un tercio de los pacientes con prótesis MoM totalmente funcionales se ha observado cierto porcentaje de intrusión en los eritrocitos, linfocitos y acumulación tisular en el sistema retículo-endotelial (nódulos linfáticos, hígado, bazo) (77). Al mismo tiempo se han detectado niveles elevados de Cr y Co con acumulación en el hígado y bazo, en pacientes con fallo de artroplastia total de cadera (78).

Estos hallazgos han sido apoyados por diversos estudios, que muestran la elevación en las concentraciones de estos metales en pacientes con prótesis de cadera MoM. Previamente se ha citado el artículo de Bradberry et al (71) que incluía una revisión bibliográfica en relación a la toxicidad sistémica (principalmente neurotoxicidad) por partículas metálicas en pacientes con prótesis de cadera. En dicha revisión se recogieron 18 casos de pacientes con estas características, de los cuales 8 eran prótesis MoM. La relación entre las manifestaciones clínicas y la toxicidad por cobalto viene dada al comprobarse que las concentraciones de este metal en suero estaban muy elevadas. Se obtuvo una media de Co de 398 (datos recogidos en el rango = 13.6-6521) $\mu\text{g/L}$. Aquellos con prótesis tipo MoM tenían una concentración media de cobalto sanguíneo de 34.5 (rango = 13.6-398.6) $\mu\text{g/L}$. Se decidió tratar a la mayoría de los pacientes (todos a excepción de 2 casos) mediante la extracción del implante con

componente metálico. En el análisis postquirúrgico se observó un descenso generalizado en la concentración de cobalto circulante y una mejora clínica clara.

Algo similar se dio en el estudio de Mao et al (77) donde se informaron dos casos de deterioro cognitivo inducidos por nanotoxicidad tras intervenciones de reemplazo de cadera por prótesis MoM. Ambos pacientes mostraron niveles de cobalto en suero de 410 (rango de referencia citado 0–20) nmol/l. En el líquido articular las concentraciones de cobalto 4218 nmol/l, es decir, diez veces la concentración detectada en suero. Tras intervenir a los pacientes de cirugía de revisión (Figura 14) los niveles de cobalto se normalizaron y los síntomas desaparecieron.



Figura 14. Preparación del vástago que reemplazará la pieza femoral que había fallado

A pesar de que los datos expuestos evidencian, un aumento en la concentración de cromo y cobalto en los fluidos biológicos de los pacientes portadores de prótesis de cadera MoM con respecto a las personas sin implantes, ha llamado la atención que estos valores pueden llegar a ser muy variables dependiendo de diversos factores; en cada estudio se utilizan distintas metodologías analíticas, diferentes tipos de muestras, los pacientes son portadores de distintos tipos de prótesis (diferentes diseños, fabricantes, etc.), las diferencias inter-individuales, los factores ambientales, la influencia de la dieta, hábitos de vida, etc.

Así, en estos casos se había observado una infiltración masiva de partículas metálicas en tejidos periprotésicos, además de unos niveles elevados en suero, que, tras la revisión y eliminación de la fuente liberadora de partículas metálicas, disminuían sus niveles rápidamente. Por tanto, sería interesante analizar el cobalto no solo en suero sino en otras matrices biológicas, pues esta liberación continua desde la prótesis favorece, como ya se expuso previamente, la alteración de la albúmina y con ellos la redistribución sistémica del cobalto y sus efectos tóxicos. Por tanto, los niveles de cobalto determinados en un momento puntual podrían no estar mostrando la carga sistémica de este elemento.

Hasta ahora los métodos usuales de seguimiento habían sido las pruebas de imagen (Figura 15) y test sencillos como los análisis de sangre, y en casos concretos, mediciones de los tejidos periprotésicos. Si bien, estos métodos se han empleado fundamentalmente a nivel de investigación, no de manera rutinaria en el hospital. Recientemente se ha propuesto un nuevo método para la determinación de metales en

el cabello que puede ser útil en los pacientes portadores de prótesis MoM con sospecha de intoxicación o para realizar su seguimiento, el análisis en cabello.



Figura 15. Rx simple de cadera en un paciente con artrosis pre (izquierda) y post (derecha) intervención de artroplastia total de cadera MoM

Esta técnica presenta un pronóstico bastante favorable, dado que evita medidas invasivas y molestias al paciente, es independiente de situaciones ocasionales y muestra verdaderamente la situación de la intoxicación. Así, el cabello presenta un potencial destacable como biomarcador al reflejar la exposición histórica a diversas sustancias, entre las que se encuentran los metales pesados (como el cobalto) (79). De hecho, la Agencia Internacional de Protección Medioambiental y la Agencia Internacional de la Energía Atómica han recomendado el empleo del cabello para monitorizar los niveles de la mayoría de los elementos traza ya que se encuentran en mayores cantidades que en otro lugar del cuerpo (80).

El cabello humano ha demostrado ser un vehículo de excreción de sustancias, incluyendo metales pesados, cuyas concentraciones aparecen diez veces por encima de los niveles encontrados en sangre u orina. Debido a que los cationes se unen a la queratina presente en la matriz capilar, este tipo de tejido resulta idóneo para el análisis de la salud en la exposición ambiental y ocupacional. Las concentraciones en sangre y orina reflejan exposiciones recientes mientras que el cabello abarca un periodo de exposición anterior (Figura 16).



Figura 16. Muestra de cabello para ser analizada

Las principales limitaciones que presenta este tipo de tejido consisten en la diferenciación entre la deposición endógena y exógena, la inconsistencia de la relación entre el estatus nutricional o síntomas clínicos y concentraciones anómalas, y finalmente, la importancia del uso de técnicas analíticas validadas correctamente (72). Estas determinaciones analíticas necesitan unos cuidados especiales en la recogida y en el traslado de las muestras y no son realizadas de manera rutinaria en los laboratorios de los hospitales generales. Además, pueden estar alteradas a través de interacciones medicamentosas o la exposición ambiental.

El estudio de metales en cabello abarca un amplio número de elementos y patologías en las que se ven implicados; el déficit de Zn y Mo podría estar relacionado con el desarrollo de cáncer esofágico, entre la población diabética (81). Se han detectado niveles de cromo en correlación negativa con respecto a los datos de glucemia y triglicéridos (82). También se han proporcionado datos de una posible relación entre el déficit de Li y el incremento de la tasa de suicidio (83). Por otra parte, en un estudio realizado en la población expuesta a metales tras la guerra de Croacia, se hallaron diferencias significativas entre población de áreas de zona de combate tras 20 años, demostrando que el cabello es un buen indicador de la exposición a largo plazo (84).

Los niveles en la población normal oscilan entre 0,11–0,52 ppm para el Cr y entre 0,004–0,14 ppm para el Co, por lo que su determinación mediante técnicas sensibles y selectivas como la espectrometría de absorción atómica (ETAAS) y la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICPMS) podría ser un buen indicador de la intoxicación por metales en las artroplastias MoM con altos niveles de concordancia (85).

Esta medición supondría un avance en la monitorización de los niveles de cromo y cobalto en los pacientes portadores de prótesis MoM, ya que, en principio, deberían de encontrarse concentraciones mayores de estas partículas en el cabello respecto a otros tejidos, estableciéndose como un tipo de detección más precoz, sensible y sencilla respecto al análisis en suero o tejidos periprotésicos. A su vez, facilitaría la demostración de dicha nanotoxicidad, todavía en debate, y en definitiva ayudaría en el manejo clínico de los pacientes expuestos a una posible nanotoxicidad por implantes protésicos con aleaciones Cr-Co.

5. CONCLUSIONES

Durante esta revisión se ha visto que el desarrollo de las nuevas tecnologías y el avance que han supuesto en los métodos de producción, han permitido la introducción de los NMs en la industria, y con ello, ha aumentado el impacto secundario sobre la vida y salud humana. Son numerosos los beneficios que ofrecen estos NMs, aun así, sus efectos secundarios son todavía poco conocidos y abarcan un espectro de actuación muy amplio y complejo.

Se ha demostrado que las NPs son capaces de penetrar en el interior celular y generar genotoxicidad, afectando al DNA de manera directa, o a través de la formación de ROS, y con ello, producir estrés oxidativo e inflamación. Estos fenómenos pueden desencadenar una serie de alteraciones celulares, incluyendo modificaciones en el DNA, apoptosis, crecimiento celular anómalo, mutaciones e inestabilidad genómica, que se traduciría en la aparición de enfermedades e incluso carcinogénesis. Aunque este último punto se encuentra en fases mucho más precoces de investigación y todavía son contrarios los resultados obtenidos en torno a la veracidad de los efectos observados.

Esta nanotoxicidad ha permitido establecer una relación entre tales fenómenos y la capacidad concreta de las NPs de Cr-Co para haber sido el factor desencadenante de la alta tasa de recambio de artroplastias de cadera MoM con aleaciones Cr-Co en los últimos años.

Así, primero se demostró la nanotoxicidad de las NPs de cobalto mediante estudios *in vitro*, especialmente genotoxicidad, en diversas especies celulares, tanto humanas como en ratones, pero son pocos los casos que lo hayan recogido *in vivo*. En el caso concreto de la carcinogénesis, solo existe un estudio *in vivo* con ratones que haya mostrado causalidad entre la exposición y la aparición de tumores, siendo una base de estudio muy débil a la hora de establecer conclusiones, por lo que todavía siguen siendo hechos aislados que necesitan un mayor estudio.

En el caso de la nanotoxicidad de las NPs Cr-Co, los diversos estudios obtuvieron resultados casi paralelos a los ya vistos en el análisis individual de las NPs de cobalto, demostrándose la capacidad genotóxica de las NPs Cr-Co, especialmente en los fibroblastos. Por el contrario, los resultados obtenidos sobre la carcinogénesis de las NPs Cr-Co fueron escasos y no concluyentes.

Cuando se trata del estudio en pacientes portadores de artroplastias de cadera MoM con aleaciones Cr-Co, los artículos publicados son aún más limitados; se han visto efectos locales en los pacientes portadores de implantes MoM y a nivel físico-químico, es posible que las NPs liberadas se distribuyan fuera del área local, pudiendo generar efectos sistémicos. Sin embargo, este tema es controvertido y variable. Diversos estudios han reportado casos de intoxicaciones por cobalto en los pacientes portadores de prótesis MoM, especialmente neurotoxicidad. Teniendo especial relevancia el descenso en los niveles de cobalto circulante y la mejoría clínica al reintervenir a los pacientes.

Finalmente, se podría concluir que el campo de investigación es todavía amplio y prometedor, pues son pocos los artículos que han tratado estos temas, especialmente

en pacientes humanos; muchos de ellos ofrecen datos observacionales y posibles asociaciones exposición-sintomatología, sin embargo, al tratarse de números reducidos de casos estudiados y ser múltiples las variables intermedias que podrían interferir en los resultados obtenidos, todavía no se ha llegado a un acuerdo común. Cabe esperar que en un futuro no muy lejano pueda establecerse un consenso, con el mayor interés sobre esta área de estudio, pues no olvidemos la cantidad de pacientes portadores de este tipo de prótesis a nivel mundial, con los cuales habría que establecer algún tipo de seguimiento ante la posible aparición de efectos adversos y necesidad de reintervención para recambio quirúrgico. Ante esta situación sería conveniente poseer un método sencillo de evaluación de los pacientes, realizando mediciones regulares de los niveles de cobalto y cromo en los tejidos biológicos, dada la asociación demostrada entre fallos de la prótesis y niveles elevados de cobalto en sangre y tejidos periprotésicos, una opción sería el análisis de cabello.

6. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría darle las gracias al Profesor Casafont por la ayuda prestada durante la realización de este TFG, destacando su disponibilidad y paciencia a la hora de guiarme en este espectro tan amplio e interesante de la medicina. Trabajar con usted ha sido muy sencillo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bailon-Moscote N, Romero-Benavides JC. Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos. Rev Toxicol. 2016;33(1):8–15.
2. Armstead AL, Li B. Nanotoxicity: Emerging concerns regarding nanomaterial safety and occupational hard metal (WC-Co) nanoparticle exposure. International Journal of Nanomedicine. 2016.
3. Buffle J. The key role of environmental colloids/nanoparticles for the sustainability of life. Environ Chem. 2006;
4. Oecd. Report of the Questionnaire on Regulatory Regimes for Manufactured Nanomaterials. Environment. 2010;
5. Lizarazo-Salcedo CG, González-Jiménez EE, Arias-Portela CY, Guarguati-Ariza J. Nanomateriales: un acercamiento a lo básico. Med Segur Trab (Madr). 2018;64(251):109–18.
6. Ocheke NA, Olorunfemi PO, Ngwuluka NC. Nanotechnology and drug delivery part 2: Nanostructures for drug delivery. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2009.
7. EC. Scientific Basis for the Definition of the Term “ Nanomaterial .” Sci Comm Emerg New Identified Heal Risks. 2010;
8. Buzza C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. Biointerphases. 2007;

9. Magaye R, Zhao J, Bowman L, Ding M. Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles (Review). *Exp Ther Med*. 2012;
10. Hansen SF, Michelson ES, Kamper A, Borling P, Stuer-Lauridsen F, Baun A. Categorization framework to aid exposure assessment of nanomaterials in consumer products. *Ecotoxicology*. 2008.
11. Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica Chimica Acta*. 2001.
12. Soenen SJ, Manshian B, Montenegro JM, Amin F, Meermann B, Thiron T, et al. Cytotoxic effects of gold nanoparticles: A multiparametric study. *ACS Nano*. 2012;
13. Karami Mehrian S, De Lima R. Nanoparticles cyto and genotoxicity in plants: Mechanisms and abnormalities. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*. 2016.
14. Naqvi S, Kumar V, Gopinath P. Nanomaterial Toxicity: A Challenge to End Users. In: *Applications of Nanomaterials*. 2018.
15. Handy RD, Shaw BJ. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: Implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Heal Risk Soc*. 2007;
16. Zhao L, Zhu Y, Chen Z, Xu H, Zhou J, Tang S, et al. Cardiopulmonary effects induced by occupational exposure to titanium dioxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 2018;
17. Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol*. 2010;
18. Duke KS, Bonner JC. Mechanisms of carbon nanotube-induced pulmonary fibrosis: a physicochemical characteristic perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2018.
19. Poulsen SS, Saber AT, Mortensen A, Szarek J, Wu D, Williams A, et al. Changes in cholesterol homeostasis and acute phase response link pulmonary exposure to multi-walled carbon nanotubes to risk of cardiovascular disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;
20. Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: A review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Particle and Fibre Toxicology*. 2010.
21. Beard JD, Erdely A, Dahm MM, de Perio MA, Birch ME, Evans DE, et al. Carbon nanotube and nanofiber exposure and sputum and blood biomarkers of early effect among U.S. workers. *Environ Int*. 2018;
22. Francisco S, John S. Conferences and Reviews Total Hip Arthroplasty. *West J Med*.

- 1995;
23. Albers A, Carli A, Daivajna S, Griffin WL, Russell R, Gross AE, et al. Revision total hip arthroplasty. In: Orthopaedic Knowledge Update: Hip and Knee Reconstruction 5. 2018.
 24. Fernandez-Lopez JC, Laffon A, Blanco FJ, Carmona L, Aretxabala I, Ballina J, et al. Prevalence, risk factors, and impact of knee pain suggesting osteoarthritis in Spain. Clin Exp Rheumatol. 2008;
 25. Madl AK, Liong M, Kovochich M, Finley BL, Paustenbach DJ, Oberdörster G. Toxicology of wear particles of cobalt-chromium alloy metal-on-metal hip implants Part I: Physicochemical properties in patient and simulator studies. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2015.
 26. Derar H, Shahinpoor M. Recent Patents and Designs on Hip Replacement Prostheses. Open Biomed Eng J. 2015;
 27. Fricka KB, Ho H, Peace WJ, Engh CA. Metal-on-Metal local tissue reaction is associated with corrosion of the head taper junction. J Arthroplasty. 2012;
 28. MacDonald SJ. Metal-on-metal total hip arthroplasty: The concerns. In: Clinical Orthopaedics and Related Research. 2004.
 29. Lachiewicz PF. Metal-on-metal hip resurfacing: A skeptic's view. In: Clinical Orthopaedics and Related Research. 2007.
 30. Amstutz HC, Grigoris P. Metal on metal bearings in hip arthroplasty. Clinical Orthopaedics and Related Research. 1996.
 31. Xia Z, Ricciardi BF, Liu Z, von Ruhland C, Ward M, Lord A, et al. Nano-analyses of wear particles from metal-on-metal and non-metal-on-metal dual modular neck hip arthroplasty. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med. 2017;
 32. Graves SE, Rothwell A, Tucker K, Jacobs JJ, Sedrakyan A. A multinational assessment of metal-on-metal bearings in hip replacement. J Bone Joint Surg Am. 2011;
 33. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, et al. Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints: A clinical and histomorphological study. J Bone Jt Surg - Ser A. 2005;
 34. Haddad FS, Thakrar RR, Hart AJ, Skinner JA, Nargol AVF, Nolan JF, et al. Metal-on-metal bearings: The evidence so far. Journal of Bone and Joint Surgery - Series B. 2011.
 35. Luo H, Wang D, He J, Lu Y. Magnetic cobalt nanowire thin films. J Phys Chem B. 2005;
 36. Bouchard LS, Anwar MS, Liu GL, Hann B, Xie ZH, Gray JW, et al. Picomolar

- sensitivity MRI and photoacoustic imaging of cobalt nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;
37. Kuo CY, Wong RH, Lin JY, Lai JC, Lee H. Accumulation of chromium and nickel metals in lung tumors from lung cancer patients in Taiwan. *J Toxicol Environ Heal - Part A Curr Issues*. 2006;
 38. Lison D, De Boeck M, Verougstraete V, Kirsch-Volders M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational and Environmental Medicine*. 2001.
 39. Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, Griffiths SM, Williams PM, Maffei TGG, et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009.
 40. Matusiewicz H. Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review. *Acta Biomaterialia*. 2014.
 41. Papageorgiou I, Brown C, Schins R, Singh S, Newson R, Davis S, et al. The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2007;
 42. Ponti J, Sabbioni E, Munaro B, Broggi F, Marmorato P, Franchini F, et al. Genotoxicity and morphological transformation induced by cobalt nanoparticles and cobalt chloride: An in vitro study in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Mutagenesis*. 2009;
 43. Peters K, Unger RE, Gatti AM, Sabbioni E, Tsaryk R, Kirkpatrick CJ. Metallic nanoparticles exhibit paradoxical effects on oxidative stress and pro-inflammatory response in endothelial cells in vitro. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;
 44. Colognato R, Bonelli A, Ponti J, Farina M, Bergamaschi E, Sabbioni E, et al. Comparative genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions on human peripheral leukocytes in vitro. *Mutagenesis*. 2008;
 45. OECD guideline. Oecd guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline 487: in vitro micronucleus test. 2004.
 46. Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K, Lison D. In vitro genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis*. 1997;
 47. De Boeck M. Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis*. 1998;
 48. Kwon YM, Xia Z, Glyn-Jones S, Beard D, Gill HS, Murray DW. Dose-dependent

- cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro. *Biomed Mater.* 2009;
49. Guildford AL, Poletti T, Osbourne LH, Di Cerbo A, Gatti AM, Santin M. Nanoparticles of a different source induce different patterns of activation in key biochemical and cellular components of the host response. *J R Soc Interface.* 2009;
 50. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: Role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis.* 2006.
 51. Hansen T, Clermont G, Alves A, Eloy R, Brochhausen C, Boutrand JP, et al. Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: Sarcoma development by nanoparticles. *J R Soc Interface.* 2006;
 52. Moulin JJ, Wild P, Mur JM, Fournier-Betz M, Mercier-Gallay M. A mortality study of cobalt production workers: An extension of the follow-up. *Am J Ind Med.* 1993;
 53. Moulin JJ, Wild P, Romazini S, Lasfargues G, Peltier A, Bozec C, et al. Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am J Epidemiol.* 1998;
 54. Tsaousi A, Jones E, Case CP. The in vitro genotoxicity of orthopaedic ceramic (Al₂O₃) and metal (CoCr alloy) particles. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2010;
 55. Parry MC, Bhabra G, Sood A, Machado F, Cartwright L, Saunders M, et al. Thresholds for indirect DNA damage across cellular barriers for orthopaedic biomaterials. *Biomaterials.* 2010;
 56. Bhabra G, Sood A, Fisher B, Cartwright L, Saunders M, Evans WH, et al. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. *Nat Nanotechnol.* 2009;
 57. Brown C, Lacharme-Lora L, Mukonoweshuro B, Sood A, Newson RB, Fisher J, et al. Consequences of exposure to peri-articular injections of micro- and nanoparticulate cobalt-chromium alloy. *Biomaterials* [Internet]. 2013;34(34):8564–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.073>
 58. Lewis CG, Belniak RM, Plowman MC, Hopfer SM, Knight JA, Sunderman FW. Intraarticular carcinogenesis bioassays of CoCrMo and TiAlV alloys in rats. *J Arthroplasty.* 1995;
 59. Goode AE, Perkins JM, Sandison A, Karunakaran C, Cheng H, Wall D, et al. Chemical speciation of nanoparticles surrounding metal-on-metal hips. *Chem Commun.* 2012;
 60. Andrews RE, Shah KM, Wilkinson JM, Gartland A. Effects of cobalt and chromium ions at clinically equivalent concentrations after metal-on-metal hip replacement on human osteoblasts and osteoclasts: Implications for skeletal health. *Bone.*

2011;

61. Long WT, Dastane M, Harris MJ, Wan Z, Dorr LD. Failure of the durom metasul® acetabular component. In: Clinical Orthopaedics and Related Research. 2010.
62. Matthies AK, Skinner JA, Osmani H, Henckel J, Hart AJ. Pseudotumors are common in well-positioned low-wearing metal-on-metal hips. In: Clinical Orthopaedics and Related Research. 2012.
63. Huber M, Reinisch G, Zenz P, Zweymüller K, Lintner F. Postmortem study of femoral osteolysis associated with metal-on-metal articulation in total hip replacement: An analysis of nine cases. J Bone Jt Surg - Ser A. 2010;
64. Gill HS, Grammatopoulos G, Adshead S, Tsialogiannis E, Tsiridis E. Molecular and immune toxicity of CoCr nanoparticles in MoM hip arthroplasty. Trends in Molecular Medicine. 2012.
65. Polyzois I, Nikolopoulos D, Michos I, Patsouris E, Theocharis S. Local and systemic toxicity of nanoscale debris particles in total hip arthroplasty. Journal of Applied Toxicology. 2012.
66. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient. A review of current knowledge and future strategies. Journal of Bone and Joint Surgery - Series B. 2007.
67. Catelas I, Campbell PA, Bobyn JD, Medley JB, Huk OL. Wear particles from metal-on-metal total hip replacements: Effects of implant design and implantation time. Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med. 2006;
68. Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, et al. Widespread dissemination of metal debris from implants. J Bone Jt Surg - Ser B. 1994;
69. Urban RM, Jacobs JJ, Gavriliovic J, Tomlinson MJ, Black J, Turner TM, et al. Dissemination of metal-alloy particles to the liver and spleen of patients with total hip or knee replacement prostheses. In: Transactions of the Annual Meeting of the Society for Biomaterials in conjunction with the International Biomaterials Symposium. 1996.
70. Jacobs JJ, Hallab NJ, Urban RM, Wimmer MA. Wear particles. In: Journal of Bone and Joint Surgery - Series A. 2006.
71. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. Clinical Toxicology. 2014.
72. Botella J, Pruebas PDE, Para A, Muestras DOS, Con R, Perdidos D. Universidad de Oviedo. Psicothema [Internet]. 2006;18(1997):342–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17295951>
73. Green B, Griffiths E, Almond S. Neuropsychiatric symptoms following metal-on-

- metal implant failure with cobalt and chromium toxicity. BMC Psychiatry. 2017;
74. MHRA. Medical Device Alert: All metal-on-metal (MoM) hip replacements. 2010.
 75. Goullé JP, Mahieu L, Castermant J, Neveu N, Bonneau L, Lainé G, et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair: Reference values. In: Forensic Science International. 2005.
 76. De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebrahimzadeh E, Pattyn C, et al. Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing. In: Journal of Bone and Joint Surgery - Series A. 2008.
 77. Mao X, Wong AA, Crawford RW. Cobalt toxicity - an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses? Medical Journal of Australia. 2011.
 78. Bjorgul K, Novicoff WN, Andersen ST, Ahlund OR, Bunes A, Wiig M, et al. High rate of revision and a high incidence of radiolucent lines around Metasul metal-on-metal total hip replacements: Results from a randomised controlled trial of three bearings after seven years. Bone Jt J. 2013;
 79. Hernández-Vaquero D, García-Pascual M, Iglesias-Fernández S, Escandon-Rodríguez A. Metal-on-metal surface hip arthroplasties. Is annual monitoring of blood metal levels necessary? Rev Esp Cir Ortop Traumatol. 2018;
 80. Bencko V. Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. Toxicology. 1995;
 81. Ray SS, Das D, Ghosh T, Ghosh AK. The levels of zinc and molybdenum in hair and food grain in areas of high and low incidence of esophageal cancer: a comparative study. Glob J Health Sci. 2012;
 82. Chung JH, Yum KS. Correlation of hair mineral concentrations with insulin resistance in Korean males. Biol Trace Elem Res. 2012;
 83. Schöpfer J, Schrauzer GN. Lithium and other elements in scalp hair of residents of Tokyo Prefecture as investigational predictors of suicide risk. Biol Trace Elem Res. 2011;
 84. Jergović M, Miškulin M, Puntarić D, Gmajnić R, Milas J, Sipos L. Cross-sectional biomonitoring of metals in adult populations in post-war eastern Croatia: Differences between areas of moderate and heavy combat. Croat Med J. 2010;
 85. Hernandez-Vaquero D, Rodríguez de la Flor M, Fernandez-Carreira JM, Sariego-Muñiz C. Detection of metal ions in hair after metal-metal hip arthroplasty. Rev Española Cirugía Ortopédica y Traumatol (English Ed. 2014;